

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

MEDICINĂ GENERALĂ

***EVALUAREA DIVERSELOR MODALITĂȚI DE MANAGEMENT AL
EȘECULUI RECURENT DE IMPLANTARE***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

ACAD. PROF. DR. MARINESCU BOGDAN

Student-doctorand:

BOLEAC IOAN

2021

CUPRINS

Lista de abrevieri

Introducere

PARTEA GENERALĂ	1
1. Noțiuni generale privind fiziologia reproducerii umane	2
1.1. Noțiuni generale de fiziologie a ciclului menstrual	2
1.1.1. Ciclul endometrial	2
1.1.2. Ciclul ovarian	6
1.2. Spermatogeneza	14
1.2.1. Spermatocitogeneza	14
1.2.2. Spermiogeneza	16
1.2.3. Reglarea hormonală a spermatogenezei	17
1.3. Fertilizarea	18
1.3.1. Captarea și transportul ovocitului	18
1.3.2. Transportul spermatozoizilor. Capacitația	19
1.3.3. Fecundația	20
1.4. Implantarea și placentarea	23
1.5. Bibliografie	27
2. Reproducere umană asistată	31
2.1. Infertilitatea	31
2.1.1. Introducere	31
2.1.2. Tratamentul chirurgical	32
2.1.3. Tratamentul medicamentos	35
2.1.3.1. Inducția de ovulație cu clomifen citrat	36
2.1.3.2. Inducția de ovulație cu inhibitori de aromatază	36
2.1.3.3. Inducția de ovulație cu gonadotropine	37
2.1.3.4. Inducția de ovulație cu GnRH pulsatil	39
2.1.4. Tehnici de reproducere umană asistată	39
2.1.4.1. Inseminarea artificială	40
2.1.4.2. Fertilizarea in vitro	43
2.1.4.2.1. Indicațiile procedurii de fertilizare in vitro	43
2.1.4.2.2. Protocoale de stimulare	51

2.1.4.2.3.	Complicațiile fertilizării in vitro	57
2.1.4.2.4.	Puncția ovariană	60
2.1.4.2.5.	Fertilizarea ovocitelor în laborator	61
2.1.4.2.6.	Cultivarea embrionilor	67
2.1.4.2.7.	Embriotransferul	71
2.2.	Istoric	74
2.3.	Bibliografie	79
3.	Eșecul recurent de implantare	85
3.1.	Definiție și evoluția ei	85
3.2.	Mecanismele normale și patologice ale implantării	87
3.3.	Etiologie	93
3.3.1.	Factori ce țin de embrioni sau de gameți	93
3.3.2.	Factori uterini	94
3.3.3.	Endometrioza	99
3.3.4.	Hidrosalpinx	100
3.3.5.	Tehnica ET	100
3.3.6.	Stimularea ovariană	101
3.3.7.	Factori imunologici și de autoimunitate	102
3.3.8.	Trombofiliile	102
3.3.9.	Defectul de fază luteală	103
3.3.10.	Stilul de viață	104
3.4.	Investigații	104
3.4.1.	Teste/ investigații pentru embrioni sau gameți	104
3.4.2.	Teste/ investigații pentru uter	106
3.4.3.	Teste imunologice	109
3.4.4.	Predicție	110
3.5.	Management	110
3.5.1.	Schimbarea stilului de viață	110
3.5.2.	Modificarea protocolului de stimulare ovariană	111
3.5.3.	Îmbunătățirea calității și selecției spermatozoizilor	112
3.5.4.	Îmbunătățirea calității și selecției embrionare	114
3.5.5.	Tehnica embriotransferului	116
3.5.6.	Embriotransfer personalizat	116
3.5.7.	Folosirea de antagonist de oxitocină	117

3.5.8. Folosirea de substanțe ce cresc aderența embrionilor	117
3.5.9. Politica “freeze-all”	117
3.5.10. Folosirea perfuziei uterine cu hCG anterior ET-ului	118
3.5.11. Tratatamentul chirurgical al factorilor uterini	118
3.5.12. Managementul endometriozei	121
3.5.13. Managementul hidrosalpinxului	121
3.5.14. Managementul endometrului subțire	122
3.5.15. Terapii experimentale	124
3.5.16. Tratatamentul endometritei cronice	124
3.5.17. <i>Endometrial scratching</i>	124
3.5.18. Imunoterapia	125
3.6. Bibliografie	127
PARTEA PERSONALĂ	142
4. Studiu: Managementul pacientelor cu eșec recurent de implantare în cadrul procedurilor de fertilizare in vitro	143
4.1. Introducere	143
4.2. Material și metodă	144
4.3. Rezultate și discuții	157
4.4. Concluzii și contribuții personale	306
4.5. Bibliografie	311
Lista de figuri	
Lista de tabele	
Lucrările elaborate în cadrul cercetărilor doctorale	

Introducere

Încă din cele mai vechi timpuri, oamenii au fost preocupați de infertilitate și au încercat să afle motivele pentru care unele cupluri nu puteau să obțină sau întâmpinau mari dificultăți în obținerea unei sarcini. În ultimele decenii, pe de o parte tratamentul infertilității a înregistrat progrese importante, iar pe de altă parte societatea a demonstrat o marcată tendință de amânare a sarcinii pentru vârste la care fertilitatea este mult scăzută în mod natural. În acest context socio-economic, tot mai multe cupluri apelează la ajutorul specialiștilor în infertilitate atunci când întâmpină dificultăți în obținerea unei sarcini.

În totalitatea femeilor cu probleme de fertilitate putem distinge un grup special de paciente, cel al pacientelor cărora li se aplică noțiunea de eșec recurent de implantare, adică mai multe eșecuri de a obține o sarcină în urma unui embriotransfer. Eșecul recurent de implantare (RIF) este o entitate complexă, care nu este încă bine formulată nici la momentul actual.

În contextul descris mai sus, lucrarea de față se apleacă asupra acestei patologii; scopul lucrării este de a analiza un grup de paciente cu RIF, din punct de vedere al profilului clinic și paraclinic, al variabilelor demografice și al metodelor specifice de tratament ale acestei afecțiuni.

Obiectivele pe care și le-a propus autorul sunt următoarele:

- Realizarea unui profil clinic al pacientei cu RIF;
- Estimarea prevalenței diferitelor cauze de infertilitate în lotul studiat;
- Identificarea factorilor de risc cu semnificație statistică pentru eșecul recurent de implantare;
- Evaluarea metodelor propuse pentru managementul acestei patologii;
- Elaborarea unui model predictiv pentru succesul unei noi proceduri de fertilizare in vitro sau embriotransfer la un cuplu cu eșec recurent de implantare.

Teza de doctorat este structurată în 4 capitole, la care se adaugă introducerea, bibliografia și listele de tabele, figuri și abrevieri.

Capitolul 1 prezintă noțiuni generale de fiziologie a reproducerii umane, din punct de vedere feminin și masculin. **Capitolul 2** analizează tehnicile folosite în prezent în reproducerea umană asistată. **Capitolul 3** este dedicat în întregime eșecului recurent de implantare, plecând de la evoluția definiției acestei noțiuni și mecanismele normale și patologice ale implantării, trecând apoi prin etiologia complexă a acestei patologii și teste și investigațiile care sunt indicate cuplurilor cu eșec recurent de implantare, și terminând cu analiza sistematică a diverselor terapii propuse pentru managementul RIF.

Capitolul 4 cuprinde activitatea proprie de cercetare, partea specială a tezei. Inițial sunt prezentate lotul studiat, protocolul de diagnostic al infertilității pe care l-au urmat toate cuplurile, criteriile de includere și excludere folosite. Urmează o amplă analiză statistică a celor 95 de cupluri care au reprezentat 149 de cazuri de eșec recurent de implantare incluse în studiu. La început, a fost realizată analiza descriptivă a variabilelor selectate pentru a realiza un profil clinic al pacientei RIF, pentru a analiza cauzele de infertilitate în lotul studiat și pentru a identifica factorii de risc semnificativi pentru eșecul recurent de implantare. În continuare este prezentată analiza de corelație a datelor obținute, prin care a fost evaluată eficiența unor metode de management al RIF, și s-a analizat asocierea celorlalte variabile selectate cu variabilele care exprimă succesul unei noi proceduri FIV sau de transfer cu embrioni congelați, adică dozarea β -hCG, rata de sarcină clinică și rata de naștere cu făt viu. Subcapitolul dedicat concluziilor și contribuțiilor personale reflectă ideile finale și cele mai importante ale lucrării de față.

I. PARTEA GENERALĂ

1. Noțiuni generale privind fiziologia reproducerii umane

1.1. Noțiuni generale de fiziologie a ciclului menstrual

Ciclul menstrual reprezintă perioada de 28 +/- 7 zile cuprinsă între 2 menstruații consecutive.

Ciclul endometrial se împarte în 2 faze: o fază proliferativă și o fază secretorie. În prima fază, care reflectă creșterea foliculului ovarian și a secreției de estrogen, toate

componentele tisulare proliferază, atingând nivelul maxim în zilele 8-10 ale ciclului (1). Faza secretorie constă în reacția endometrului la acțiunea combinată a estrogenului și progesteronului.

Ciclul ovarian cuprinde faza foliculară, ovulația și faza luteala.

1.2. Spermatogeneza

Spermatogeneza, procesul de formare a spermatozoizilor, cunoaște 2 etape: spermatocitogeneza, o etapă de multiplicare, și spermiogeneza, o etapă de diferențiere. **Spermatocitogeneza**, ce începe la pubertate, cuprinde mai multe diviziuni mitotice și meiotice. **Spermiogeneza** este procesul de diferențiere al spermatidei într-un spermatozoid printr-o serie de modificări morfologice.

1.3. Fertilizarea

După ovulație, complexul ovocit – cumulus oophorus este captat de pavilionul tubar și ajunge în porțiunea ampulară a trompei. După ce parcurg canalul cervical și cavitatea uterină, spermatozoizii pătrund în trompa uterină, unde suferă procesul de capacitate, dobândind potențial fecundant. Spermatozoidul recunoaște anumite molecule glicoproteice de pe suprafața ovocitului, ceea ce declanșează reacția acrozomială; apoi spermatozoidul fuzionează cu ovocitul, este completată cea de-a doua diviziune meiotică a ovocitului, se formează cei 2 pronuclei, și în urma amestecării materialului lor genetic, se formează zigotul.

1.4. Implantarea și placentatia

Embrionul pătrunde în cavitatea uterină în stadiul de morulă, apoi acumulează fluid între celulele sale și ajunge la stadiul de blastocist. El aderă la peretele uterin prin intermediul integrinelor, apoi penetrează epiteliul și sistemul circulator matern. Placenta începe să se formeze la 2 săptămâni după fertilizare.

2. Reproducere umană asistată

Infertilitatea reprezintă absența sarcinii după un an de contact sexual neprotejat cu o frecvență rezonabilă. Ea afectează 10% - 15% dintre cuplurile de vârstă reproductivă.

Tratamentul chirurgical al factorilor feminini de infertilitate se face majoritar prin chirurgie endoscopică.

Medicația pentru inducție de ovulație se adresează pacientelor cu anovulație grupa II și I OMS. Medicamentele cu administrare orală cuprind Clomifen Citrat și inhibitori de aromatază, iar cele injectabile sunt reprezentate de către gonadotropinele exogene.

Inseminarea artificială (IA) presupune manipularea gameților masculini în afara organismului, prelucrarea în laborator și introducerea lor intrauterin, în perioada fertila. Procedura este indicată în anumite situații: patologie masculină minoră, disfuncții ejaculatorii, infertilitate de cauză cervicală, infertilitate idiopatică și inseminare cu spermă de la donator. Procedura este simplă, nedureroasă, rapidă, și se efectuează, de regulă, ambulator.

Termenul de **fertilizare in vitro (FIV)** cuprinde o secvență de proceduri care începe cu hiperstimularea ovariană controlată, continuă cu recoltarea ovocitelor prin puncția ovariană ghidată ecografic, fertilizarea și cultivarea embrionilor în laborator și se încheie cu transferul acestora intrauterin. Indicațiile fertilizării in vitro sunt reprezentate de: patologia tubară, patologia masculină majoră; eșecul tratamentelor convenționale în caz de endometrioză severă sau rezervă ovariană redusă; programe de donare de ovocite sau embrioni; prezervarea fertilității (crioprezervare de ovocite sau de embrioni); diagnostic genetic preimplantațional.

Protocolele de stimulare ovariană folosite în FIV pot fi cu agonisti de GnRH sau cu antagoniști de GnRH. Dacă ne referim la cele cu agonisti de GnRH, ele sunt în număr de 3: protocolul lung, cel scurt și cel ultracurt, dar cel care s-a impus de departe în practica clinică este protocolul lung. Protocolul cu antagoniști de GnRH prezintă câteva avantaje, în condițiile unor rate de sarcină clinică și naștere similare celui cu agonisti de GnRH: incidența mai mică a OHSS, posibilitatea folosirii agonistului de GnRH ca trigger pentru ovulație (ceea ce aproape elimină OHSS), faptul că dozele și durata tratamentului cu gonadotropine sunt mai mici.

Puncția ovariană se realizează în prezent pe cale vaginală, sub control ecografic, la un interval de 35-36 de ore de la administrarea trigger-ului, cu pacienta aflată de regulă sub

anestezie generală, dar poate fi efectuată și cu anestezie locală sau regională, sau chiar fără anestezie, dacă pacienta are puțini foliculi.

Ovocitele recoltate sunt apoi fertilizate în laborator prin două tehnici: standard sau ICSI. După evaluarea fertilizării, embrionii sunt cultivați în laborator pentru un interval de timp ce variază între 2 și 6 zile; în prezent evaluarea viabilității embrionilor se bazează pe criterii morfologice sau morfocinetice, dar viitorul aparține evaluării schimbărilor petrecute în metabolismul embrionilor.

Embriotransferul este cea mai sensibilă etapă a întregii proceduri de fertilizare in vitro. Relativ recent, numeroase studii și metaanalize au demonstrat creșterea ratei de sarcină clinică în urma utilizării ghidajului ecografic, prin reducerea incidenței transferurilor dificile, vizualizarea vârfului cateterului lângă fundul uterului, și reducerea traumatizării uterului și a stimulării contracțiilor uterine.

3. Eșecul recurent de implantare

3.1. Definiție și evoluția ei

Eșecul recurent de implantare (RIF) este o entitate clinică ce este caracterizată de multiple eșecuri de a obține o sarcină după embriotransfer. Începând cu 1995, de când datează cea mai veche definiție a RIF, mai mulți autori au încercat să definească această entitate, luând în considerare diferite criterii. Cea mai completă definiție, și totodată cea mai larg acceptată în comunitatea științifică, a venit de la Coughlan în 2014: eșecul de a obține o sarcină clinică după transferul a cel puțin patru embrioni de calitate bună în cel puțin trei cicluri fresh sau cu decongelare la o femeie cu vârsta sub 40 de ani (2).

3.2. Mecanismele normale și patologice ale implantării

Implantarea nu necesită doar un endometru receptiv și un embrion de calitate bună, ci și un dialog sincronizat între țesuturile materno și fetale. La specia umană, fereastra de implantare este largă, întinzându-se între zilele 20 și 24 ale unui ciclu menstrual ideal de 28 de zile. Fereastra de implantare poate fi caracterizată din punct de vedere histologic, al

markerilor biochimici și celulari de implantare, imunologic și prin alcătuirea profilului de expresie genică a celulelor endometriale.

3.3. Etiologie

Am încercat să sistematizez factorii implicați în etiologia RIF: factori ce țin de embrioni sau de gameți (calitatea ovocitelor, calitatea spermei, anomalii cromozomiale parentale); factori uterini: congenitali (anomalii uterine congenitale), dobândiți (fibroame uterine submucoase și intramurale, polipi endometriali, aderențe intrauterine, adenomioza, endometrită cronică, endometru subțire) și deplasarea ferestrei de implantare; endometrioză; hidrosalpinx; tehnica ET; stimularea ovariană; factori imunologici și de autoimunitate; trombofiliile congenitale și dobândite; stilul de viață.

3.4. Investigații

În acest subcapitol am abordat investigațiile utile pacienților cu RIF, atât testele sau investigațiile pentru embrioni sau gameți, cât și pe cele pentru uter. Dacă vorbim despre investigarea uterului, trebuie să menționez studiul TROPHY, care a investigat rolul histeroscopiei la pacienta RIF; studiul a concluzionat că histeroscopia efectuată înaintea ciclului FIV la o pacientă RIF care prezintă aspect ecografic normal al cavității uterine nu îmbunătățește ratele de sarcină clinică și de naștere cu făt viu (3). Intrat relativ recent în practica curentă, testul ERA investighează deplasarea ferestrei de implantare; el analizează o biopsie a endometrului pacientei și compară setul de gene respectiv cu semnătura genetică a diferitelor faze ale ciclului endometrial, clasificând endometrul respectiv ca endometru proliferativ, prerenal, receptiv sau postreceptiv.

3.5. Management

Ultima parte a acestui capitol am dedicat-o managementului eșecului recurent de implantare. Astfel, am analizat diverse terapii: de la cele generale, ca modificarea stilului de viață pentru ambii parteneri, până la cele țintite, cum ar fi managementul endometrului subțire; de la modalități de îmbunătățire a selecției spermatozoizilor și embrionilor, până la embriotransferul personalizat, în concordanță cu rezultatul testului de receptivitate endometrială; de la tratamentul chirurgical al factorilor uterini, până la folosirea de substanțe ce cresc aderența embrionilor; de la tratamentul endometriozei, până la endometrial scratching și diversele imunoterapii. Toate terapiile au fost analizate cu obiectivitate, în funcție de nivelul de evidență din literatura științifică.

II. PARTEA PERSONALĂ

4. Studiu clinic: Managementul pacientelor cu eșec recurent de implantare în cadrul procedurilor de fertilizare in vitro

4.1. Introducere

Studiul de față a analizat un lot de paciente cu eșec recurent de implantare, având următoarele obiective: realizarea unui profil clinic al pacientei cu RIF;

- estimarea prevalenței diferitelor cauze de infertilitate în lotul studiat;
- identificarea factorilor de risc pentru eșecul recurent de implantare semnificativi din punct de vedere statistic;
- evaluarea eficienței metodelor propuse în ultimii ani în managementul acestei entități;
- elaborarea unui model predictiv pentru succesul unei noi proceduri FIV la un cuplu ce prezintă RIF.

4.2. Material si metodă

Am analizat dosarele medicale a 3111 cupluri care s-au adresat unei clinici private pentru tratamentul infertilității în perioada 1 ianuarie 2012 – 31 mai 2018.

Am folosit următoarele criterii de includere: vârsta pacientei mai mică de 40 de ani, lipsa obținerii sarcinii clinice după efectuarea a minimum 3 ET cu embrioni *fresh* sau decongelați, transferul a minimum patru embrioni de calitate înaltă; asta înseamnă embrioni cu șapte sau opt celule, cu blastomere simetrice și fără fragmentații, sau cu fragmentații care reprezintă mai puțin de 10% din volum, conform consensului de la Istanbul, pentru embrionii de ziua a treia, sau blastociști AA, AB și BA, ce au atins stadiul 3, 4 sau 5 de expansiune blastocelică în ziua a cincea de cultură, conform sistemului de gradare Gardner și Schoolcraft (4).

Criterile de excludere au fost: vârsta pacientei mai mare sau egală cu 40 de ani, efectuarea unui număr de doar 1 sau 2 ET fără obținerea sarcinii clinice, transferul a mai puțin de patru embrioni de calitate înaltă, lipsa documentelor care să ateste calitatea embrionilor transferați, transferul de embrioni de calitate scăzută, obținerea sarcinii clinice în urma ET.

În urma folosirii acestor criterii, am selectat un lot de 95 de cupluri care au reprezentat 149 de cazuri de eșec recurent de implantare.

În cazul pacientelor care au urmat o nouă procedură FIV, au fost folosite 2 protocoale de hiperstimulare ovariană controlată: protocolul lung cu agoniști de GnRH și protocolul scurt cu antagoniști de GnRH. Când cel puțin 3 foliculi au ajuns la dimensiunea de 18 mm, s-a efectuat inducția ovulației; puncția ovariană a fost realizată la un interval de 35 – 36 de ore de la administrarea trigger-ului. Fertilizarea ovocitelor a fost realizată fie prin tehnica FIV standard, fie prin tehnica ICSI. După evaluarea fertilizării, embrionii au fost cultivați în laborator, pentru o perioadă de 2 – 6 zile, în funcție de numărul și calitatea lor. Embriotransferul a fost realizat intrauterin transcervical, sub ghidaj ecografic, în zilele 2 – 6, cel mai frecvent în zilele 3 sau 5. În cazul pacientelor care nu au realizat o nouă procedură FIV, ci doar embriotransfer cu embrioni decongelați, transferul a fost efectuat fie pe ciclu natural, fie pe ciclu artificial, folosind o schemă pregătitoare a endometrului cu estrogeni și progesteron.

4.3. Rezultate și discuții

Am început prin a prezenta analiza descriptivă a variabilelor pe care le-am selectat, cu scopul de a realiza profilul clinic al pacientei RIF, a estima prevalența cauzelor de infertilitate în lotul studiat și a identifica factorii de risc cu semnificație statistică pentru RIF.

Vârsta medie a pacientelor cuprinse în studiu este de 35,32 ani; majoritatea fac parte din categoria de vârstă 30 – 34 de ani (36,9%). 74,5% dintre pacientele participante la studiu au avut o greutate normală, 20,1% au fost supraponderale, iar 5,4% au fost subponderale. Valoarea medie a AMH s-a situat la 2,74 ng/ml, iar numărul mediu al foliculilor antrali s-a ridicat la 11,6. Am constatat astfel că majoritatea pacientelor RIF din lotul studiat au rezervă ovariană normală.

Peste jumătate dintre subiecții studiului au efectuat histeroscopie (51,7%); dintre cazurile care au efectuat histeroscopie, 66,2% au avut un rezultat normal, la 14,3% s-a diagnosticat un polip endometrial, iar la 13% prezența sinechiei uterine. Testul ERA a fost efectuat în 22 de cazuri; dintre acestea, 11 persoane au avut endometrul receptiv, 10 endometru preredeptiv, iar o persoană a avut endometru postreceptiv. Rezultatele pe care le-am găsit în lotul pe care l-am studiat nu se suprapun exact peste datele din literatură: un studiu realizat în 2013 de către Ruiz-Alonso et al asupra 85 de paciente RIF a găsit endometrul receptiv la 3 din 4 paciente, față de lotul meu, unde 50 % dintre paciente au avut endometrul receptiv (5).

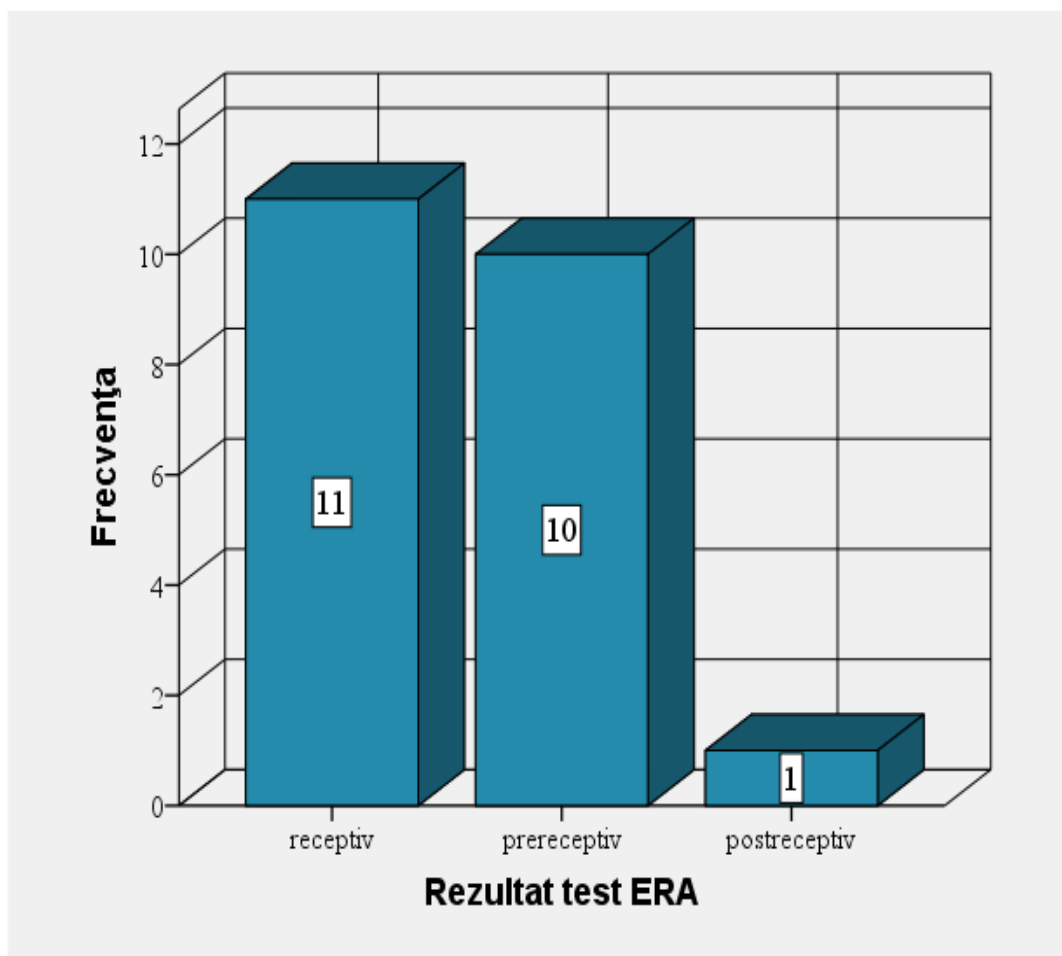


Figura 4.1 – Distribuția pacienților în funcție de rezultatul testului ERA

14,1% dintre cazurile RIF cuprinse în studiu au beneficiat de procedura de scratching endometrial.

Pentru 38,3% dintre femeile studiate infertilitatea a fost de cauză tubară, pentru 22,1% lipsa sarcinii s-a datorat infertilității masculine, pentru 19,5% cauzele sunt neexplicate, iar pentru 10,1% cauza este de natură ovariană; în procente mult mai reduse am constatat cauze de infertilitate precum cauză mixtă, endometrioză sau PCOS. Datele din studiul prezent sunt în concordanță cu cele din literatura de specialitate, pe primele două locuri situându-se factorul tubar și infertilitatea masculină.

Valoarea medie a ovocitelor recoltate pentru participantele la studiu care au făcut o nouă procedură FIV s-a situat la 8.10, valorile extreme fiind 2 și 22 ovocite. În 78,7% din cazuri, fertilizarea ovocitelor a fost efectuată prin tehnica standard, în 19,1% din cazuri prin tehnica ICSI, iar 2,2% din cazuri au beneficiat de tehnica split FIV/ICSI. Rezultatele mele

se află astfel într-o contradicție clară cu tendința actuală, pentru că la nivel internațional tehnica ICSI este folosită cel mai frecvent. Explicația folosirii majoritare a tehnicii standard de fertilizare în studiul de față este dată de faptul că în primii ani ai acestui deceniu laboratorul clinicii private unde au fost efectuate procedurile aveau puțină experiență cu această procedură, iar cazurile în care se foloseau ovocite crioprezervate anterior sau spermă testiculară sau epididimală, proaspătă sau congelată, erau reduse ca și număr. Pentru nu mai puțin de 86,6% dintre femeile participante la studiu embriotransferul a fost efectuat în ziua 5; deci transferul de blastociști a fost clar majoritar comparativ cu transferul embrionilor în stadiul de clivaj, în ideea reducerii numărului sarcinilor multiple printr-o mai bună selecție a embrionilor. Numărul embrionilor transferați a variat de la 1 la 4.

Rata de succes a procedurii FIV/ET la pacientele cuprinse în studiu a fost apreciată prin valoarea β -hCG, sarcina clinică și nașterea cu făt viu („live birth rate”), adică modalitățile prin care este apreciat succesul unei proceduri FIV în practica curentă. La 50,3% dintre cazurile luate în studiu, β -hCG a fost pozitiv, rata de sarcină clinică a fost de 37,6%, iar în 30,9% dintre cazuri a fost înregistrată nașterea a cel puțin unui copil.

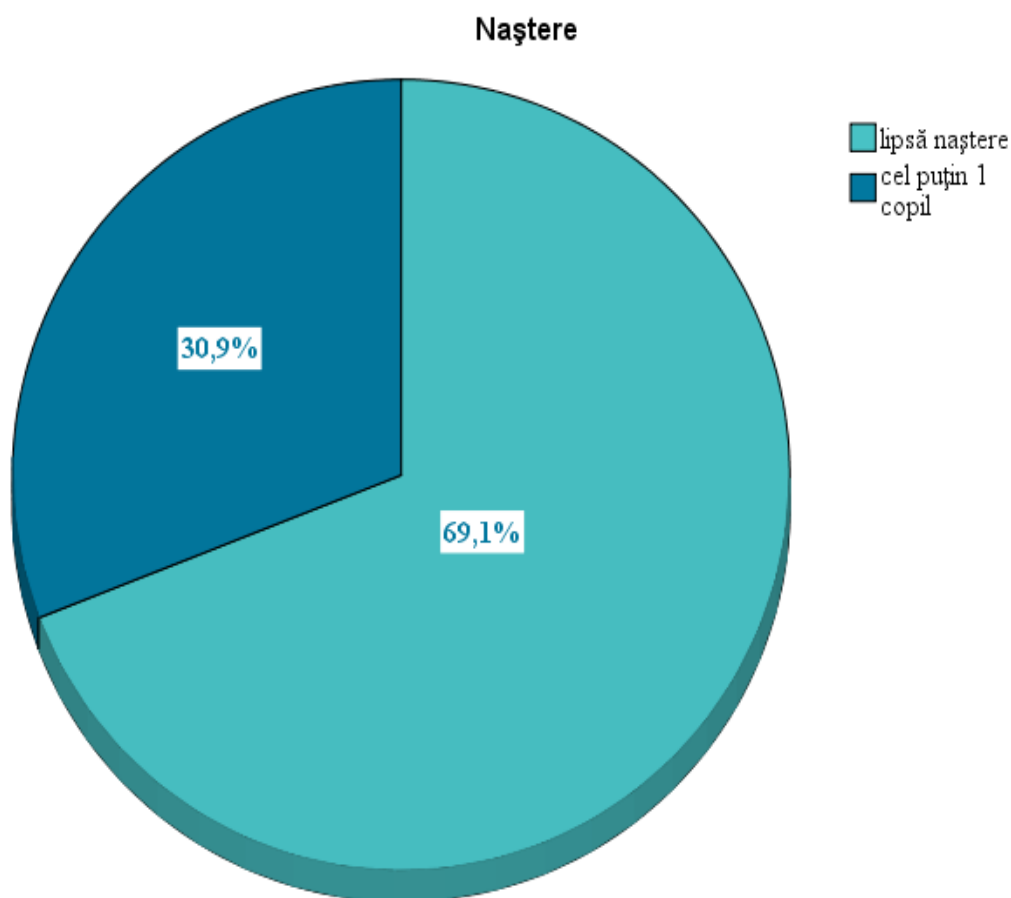


Figura 4.2 – Distribuția pacientelor în funcție de prezența nașterii

În continuare am realizat analiza de corelație a datelor obținute: am evaluat eficiența unor metode propuse în ultimii ani în managementul RIF, adică histeroscopia, testul ERA și scratching-ul; am analizat asocierea celorlalte variabile cu variabilele care exprimă succesul unei proceduri FIV (dozarea β -hCG, rata de sarcină clinică, rata de naștere cu făt viu), în scopul elaborării unui model predictiv pentru succesul unei noi proceduri FIV la un cuplu ce prezintă RIF; în final am analizat gradul de semnificație statistică a asocierilor dintre diverse variabile folosite pentru caracterizarea lotului studiat.

Efectuând analiza de corelație am găsit o asociere cu semnificație statistică de intensitate moderată între efectuarea histeroscopiei și numărul de copii născuți.

Tabel 4.1 – Corelația dintre efectuarea histeroscopiei și numărul de copii născuți

			Număr copii născuți			Total
			0	1	2	
Histeroscopie	Da	Frecvența	2	22	6	30
		%	6,7%	73,3%	20,0%	100,0%
	Nu	Frecvența	8	12	6	26
		%	30,8%	46,2%	23,1%	100,0%
Total	Frecvența	10	34	12	56	
	%	17,9%	60,7%	21,4%	100,0%	

$\chi^2=6,28$; $df=2$; $p=0,043$; Cramer's $V=0,335$

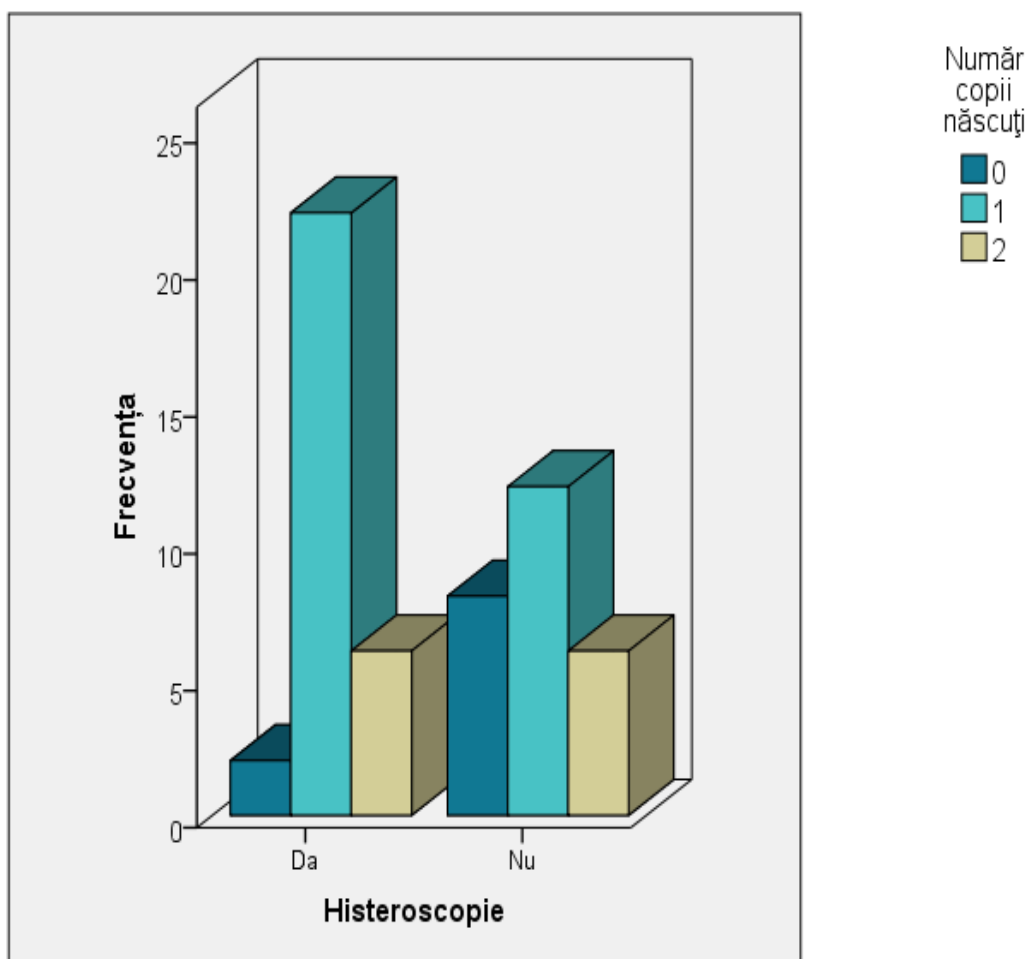


Figura 4.3 – Corelația dintre efectuarea histeroscopiei și numărul de copii născuți

Pe de altă parte, am găsit că între efectuarea unei histeroscopii diagnostice și succesul unei noi proceduri FIV-ET la o pacientă diagnosticată cu RIF nu există o asociere semnificativă statistic; acest rezultat se află în concordanță cu rezultatele mai multor studii ce au fost efectuate cu privire la utilitatea histeroscopiei diagnostice la pacientele cu RIF. Astfel, o metaanaliză efectuată în 2019 a găsit că histeroscopia efectuată anterior unei noi proceduri FIV la o pacientă cu RIF a îmbunătățit ratele de implantare și de sarcină clinică, dar nu a influențat ratele de avort și de naștere (6). Kamath, Sunkara și colaboratorii lor, au efectuat două metaanalize în 2019 și nu au găsit dovezi de o calitate înaltă că folosirea de rutină a histeroscopiei aduce vreun beneficiu pacientelor subfertile ce vor efectua FIV, fie că vorbim despre populația generală, fie că vorbim despre paciente cu două sau mai multe eșecuri FIV în antecedente (7, 8). Tot în urma analizei de corelație am ajuns la concluzia că între histeroscopia operatorie pentru sinechie uterină, polip endometrial, fibrom uterin sau sept uterin și succesul unei proceduri FIV-ET la o pacientă RIF nu există o asociere

semnificativă statistic. Acest rezultat se află parțial în contradicție cu rezultatele altor studii. În ceea ce privește aderențele intrauterine și polipii endometriali, nu avem dovezi ferme în literatura de specialitate, ci doar dovezi indirecte, că îndepărtarea chirurgicală ar duce la creșterea ratei de implantare. Însă septul uterin face parte din anomaliiile congenitale uterine care necesită tratament chirurgical înaintea procedurii FIV. Privitor la fibroamele uterine submucoase, metaanaliza lui Pritts din 2009 a arătat că ele scad semnificativ ratele de implantare, sarcină clinică și naștere cu făt viu și cresc semnificativ rata de avort (9). Efectul fibroamelor intramurale asupra rezultatelor FIV este controversat. Rezultatele studiului meu privitor la histeroscopia operatorie pentru fibrom și sept uterin pot fi puse pe seama numărului mic de cazuri cu fibrom, respectiv cu sept, cuprinse în studiu, ceea ce generează o putere redusă a studiului.

Analiza de corelație a datelor mi-a arătat că între efectuarea unui test ERA înainte de un nou embriotransfer la o pacientă cu RIF și succesul acestui embriotransfer nu există o asocieră cu semnificație statistică. Utilitatea testului ERA este destul de controversată la momentul actual în comunitatea științifică. Un studiu retrospectiv multicentric publicat în 2020 ce a inclus 2598 paciente cu RIF a evaluat utilitatea testului ERA și a PGT-A; una dintre concluziile studiului a fost că testul ERA nu a îmbunătățit rezultatele reproductive la aceste paciente (10).

Tot din analiza datelor a reieșit că efectuarea unui scratching în faza luteala a ciclului anterior procedurii FIV/ET sau TEC se asociază semnificativ statistic cu obținerea unei sarcini clinice și a unei nașteri cu făt viu.

Tabel 4.2 – Corelația dintre efectuarea scratching-ului și prezența sarcinii clinice

			Sarcină clinică		Total
			pozitiv	negativ	
Scratching	Da	Frecvența	12	9	21
		%	57,1%	42,9%	100,0%
	Nu	Frecvența	44	84	128
		%	34,4%	65,6%	100,0%
Total		Frecvența	56	93	149
		%	37,6%	62,4%	100,0%

$\chi^2=3,98$; $df=1$; $p=0,046$; Cramer's $V=0,164$

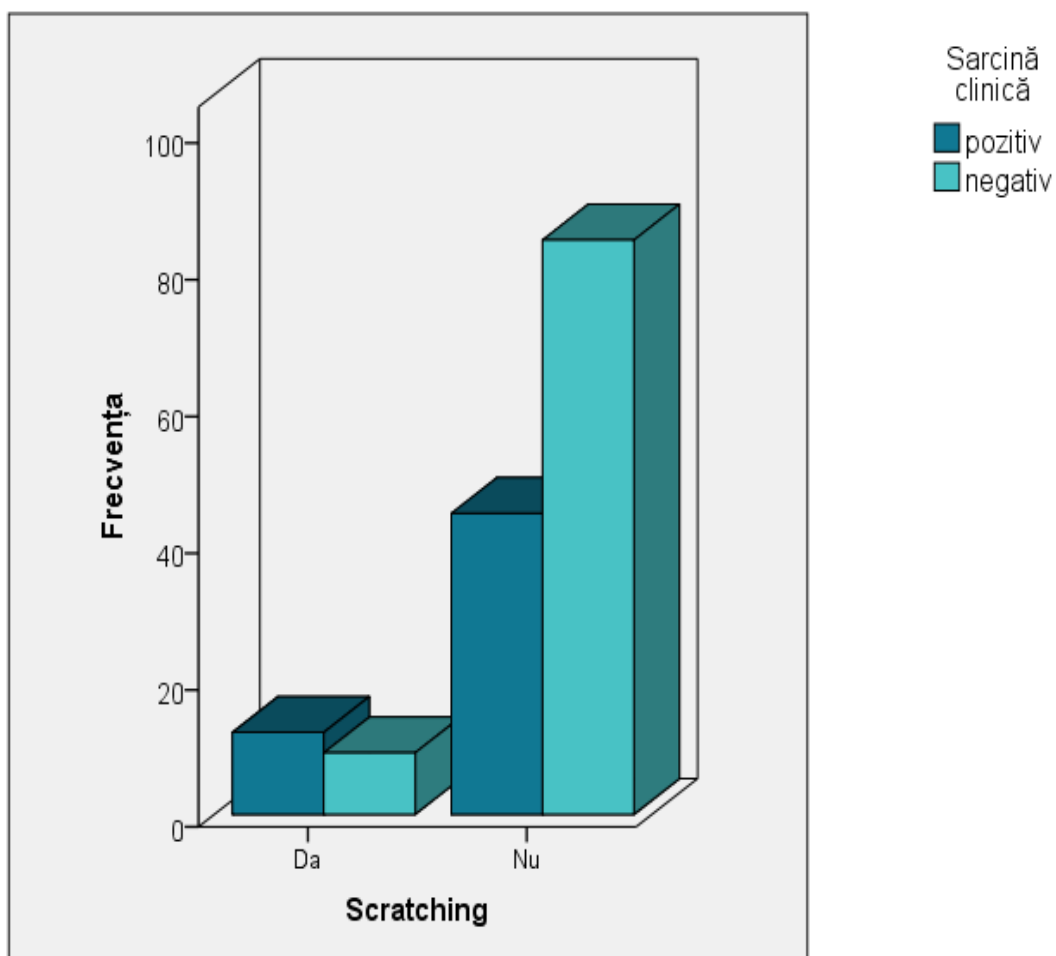


Figura 4.4 – Corelația dintre efectuarea scratching-ului și prezența sarcinii clinice

Tabel 4.3 – Corelația dintre efectuarea scratching-ului și prezența nașterii

		Naștere		Total	
		lipsă naștere	cel puțin 1 copil		
Scratching	Da	Frecvența	10	11	21
		%	47,6%	52,4%	100,0%
	Nu	Frecvența	93	35	128
		%	72,7%	27,3%	100,0%
Total	Frecvența	103	46	149	
	%	69,1%	30,9%	100,0%	

$\chi^2=5,29$; $df=1$, $p=0,021$; Cramer's $V=0,189$

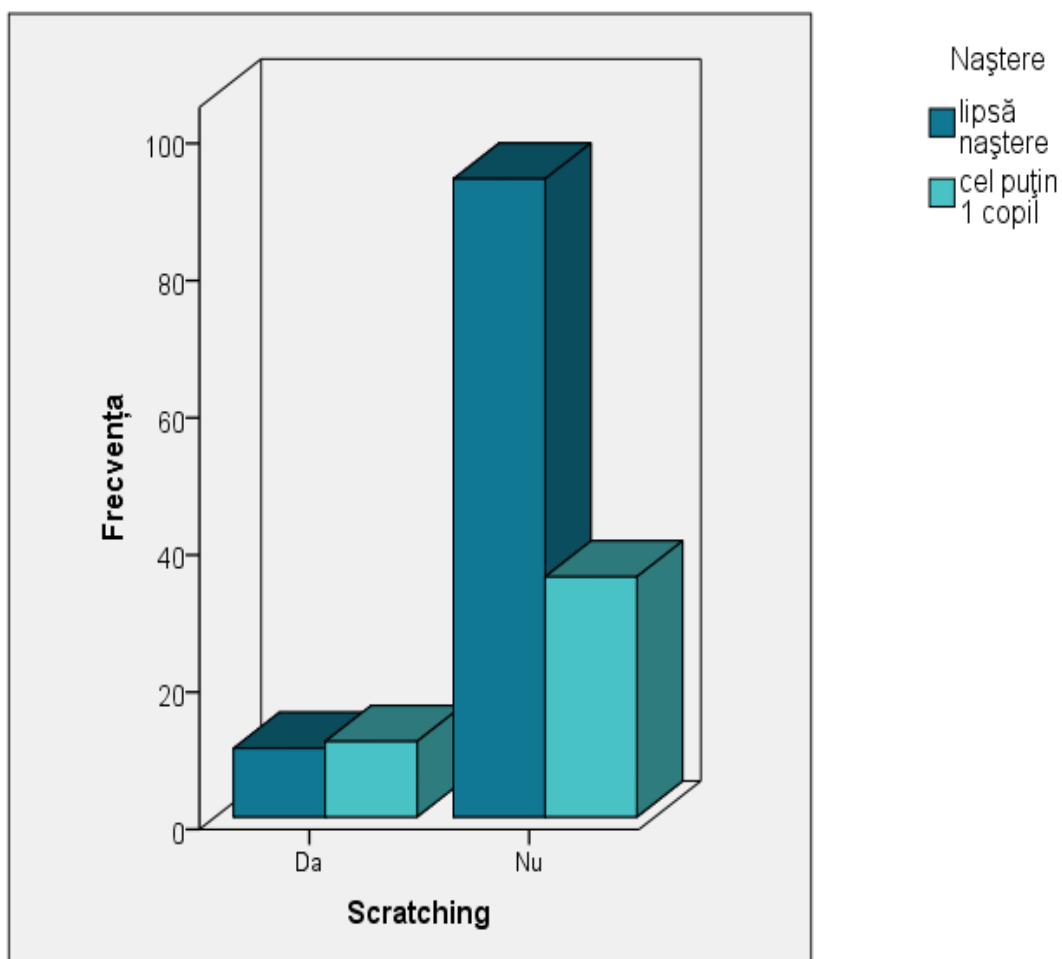


Figura 4.5 – Corelația dintre efectuarea scratching-ului și prezența nașterii

Rezultatele mele sunt astfel în concordanță cu rezultatele altor studii și meta-analize efectuate privitor la acest subiect. De exemplu, meta-analiza efectuată în 2012 de către El-Toukhy și colaboratorii săi a arătat că practicarea scratching-ului a dus la creșterea semnificativă a ratei de sarcină clinică, atât în studiile randomizate, cât și în cele nerandomizate (11). Lensen și colaboratorii săi au publicat în 2019 rezultatele unui studiu randomizat controlat multicentric ce a inclus 1364 paciente propuse pentru FIV; concluzia studiului a fost că scratching-ul nu a dus la rate mai mari de sarcină clinică și naștere în rândul femeilor ce au efectuat procedura FIV (12). Un alt RCT multicentric publicat în 2019 a inclus 304 paciente cu unul sau mai multe eșecuri de implantare în antecedente; rezultatul la care a ajuns studiul a fost că scratching-ul endometrial în faza luteala a ciclului anterior stimularii ovariene îmbunătățește semnificativ rata de sarcină clinică la femeile cu 3 sau mai multe eșecuri de implantare anterioare; nu au fost notate diferențe semnificative în ceea ce privește rata de naștere (13). Studiul randomizat controlat SCRaTCH publicat în 2021 s-a adresat pacientelor cu un ciclu FIV/ICSI eșuat în antecedente și a vrut să afle dacă efectuarea

scratching-ului influențează rata de naștere într-un ciclu FIV/ICSI fresh ulterior. Rata de naștere după al doilea ciclu FIV/ICSI a fost cu 4,6% mai mare după scratching-ul endometrial; autorii studiului au concluzionat că rezultatele sugerează că posibilul efect al scratching-ului s-ar putea să fie mai mic decât s-a anticipat și/sau s-ar putea aplica doar anumitor grupuri de paciente (14).

Dacă ne referim la variabilele AMH și AFC, statistica datelor mele a găsit următoarele rezultate: AMH nu s-a asociat semnificativ statistic cu rata de succes a unei noi proceduri FIV sau TEC la pacienta cu RIF; în ceea ce privește AFC, am găsit o asociere semnificativă statistic între clasificarea AFC și numărul de copii născuți.

Tabel 4.4 – Corelația dintre grupele de AFC și numărul de copii născuți

				Număr copii născuți			Total
				0	1	2	
Clasificare AFC	≤4	FA	Frecvența	1	7	1	9
	fertilitate mult diminuată		%	11,1%	77,8%	11,1%	100,0%
	5-9	FA	Frecvența	8	7	5	20
	fertilitate redusă (borderline)		%	40,0%	35,0%	25,0%	100,0%
	≥10	FA	Frecvența	1	19	6	26
	fertilitate normală		%	3,8%	73,1%	23,1%	100,0%
Total			Frecvența	10	33	12	55
			%	18,2%	60,0%	21,8%	100,0%

$\chi^2=12,30$; $df=4$; $p=0,015$; Cramer's $V=0,334$

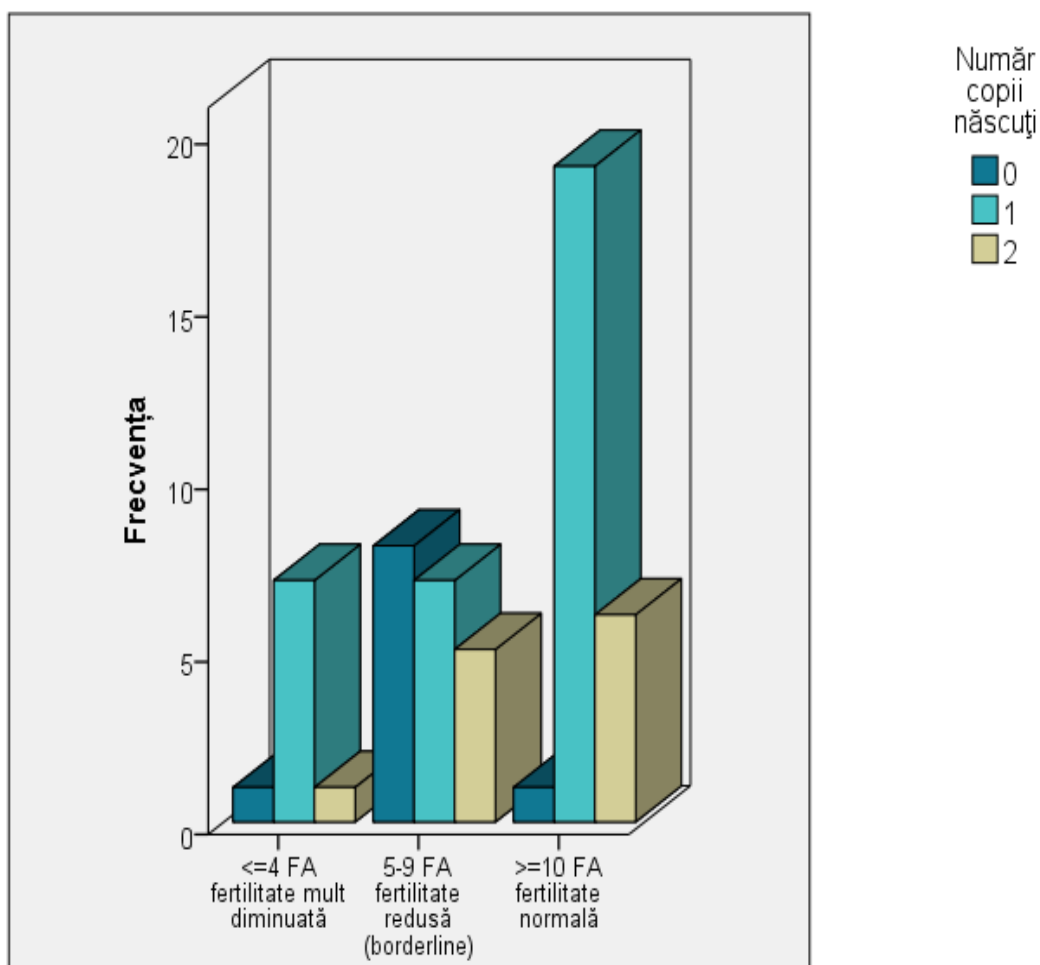


Figura 4.6 – Corelația dintre grupele de AFC și numărul de copii născuți

Referindu-ne la legătura dintre AMH și AFC pe de o parte, și ratele de sarcină clinică și naștere ale procedurilor FIV pe de altă parte, lucrurile nu sunt foarte lămurite nici în literatura de specialitate. AMH este puternic legat de răspunsul cantitativ în ART, el este un bun indicator al rezervei ovariene și poate prezice un răspuns ovarian extrem (excesiv sau redus); însă valoarea AMH ca predictor al ratei de nașteri este încă neclară; o meta-analiză din 2014 a ajuns la concluzia că AMH poate avea o valoare predictivă limitată pentru obținerea sarcinii în studiile în care este controlat pentru vârstă (15). În 2020 a apărut un studiu prospectiv care a confirmat faptul că AMH este un bun predictor al rezervei ovariene, însă are o capacitate limitată în predicția obținerii sarcinii (16). AFC este considerat de către mulți autori ca fiind cel mai bun predictor al numărului de ovocite recoltate. Dacă ne referim la rata de naștere, din nou părerile sunt împărțite: unele studii ajung la concluzia că AFC nu reflectă calitatea ovocitelor sau a embrionilor și nu se corelează cu rata de naștere, alte studii au descris o corelație între AFC și rata de naștere, după ce s-a făcut ajustarea pentru vârstă

și recoltă ovocitară (17). Un studiu din 2019 a analizat influența AFC asupra rezultatelor procedurilor FIV și a ajuns la concluzia că există o asociere puternică între AFC și rata de sarcină clinică în urma procedurilor FIV/ICSI (18). Studiul publicat în 2018 de către Lee et al a evaluat tot utilitatea clinică a AMH și AFC; concluzia studiului a fost că, la pacientele cu vârsta peste 40 de ani, AFC și AMH sunt biomarkeri buni pentru predicția sarcinii clinice și a nașterii (19). Lucrarea realizată de către Metello și colaboratorii săi, publicată în 2019, a căutat un predictor al nașterii după o procedură FIV; studiul a arătat că AMH, AFC și vârsta se asociază independent cu rata de naștere (20).

Nu am putut dovedi prezența unei relații semnificative statistic între numărul de ovocite recoltate la puncția ovariană și rata de succes a fertilizării in vitro la o pacientă cu RIF. Rezultatele studiului meu vin astfel în contradicție cu cele ale altor studii care au urmărit corelația dintre numărul de ovocite recoltate și rata de sarcină sau de naștere, încercând să găsească un număr optim de ovocite pentru maximizarea șanselor de succes. Poate cel mai cunoscut studiu în acest sens este cel realizat de Sunkara și colaboratorii săi în 2011; lucrarea a găsit o corelație semnificativă între numărul de ovocite recoltate și rata de naștere și a demonstrat că o creștere a numărului de ovocite recoltate nu este legată în mod liniar de creșterea ratei de nașteri (21). Astfel, în studiul menționat, rata de nașteri a crescut până la un număr de 15 ovocite recuperate, apoi a prezentat un platou pentru 15 - 20 de ovocite obținute, după care a scăzut la peste 20 de ovocite recuperate, probabil din cauza concentrației mare de estradiol care a afectat calitatea endometrului și a ovocitelor. O posibilă explicație a rezultatelor contradictorii obținute în teza mea este lotul mic de paciente cu RIF studiat, care nu a reușit să atingă o semnificație statistică.

Studiul meu nu a găsit o relație semnificativă statistic între ziua embriotransferului și succesul fertilizării in vitro sau transferului de embrioni crioprezervati. Însă în prezent rezultatele multor studii care au încercat să afle momentul optim de transfer al embrionilor, stadiul de clivaj sau stadiul de blastocist, indică transferul de blastocisti ca fiind cel cu rata mai mare de succes. Motivul pentru care studiul meu nu a obținut această relație semnificativă statistic este, cel mai probabil, numărul scăzut de cazuri în care s-a efectuat embriotransferul în stadiul de clivaj, predominând puternic transferul de blastociști.

Am obținut o asociere semnificativă statistic între vârsta pacientei și cauzele de infertilitate. Incidența crescută a factorului masculin în cazul cuplurilor în care femeia are vârstă sub 30 de ani se datorează probabil incidenței crescute a bolilor cu transmitere sexuală, care afectează spermatogeneza prin creșterea producției de radicali liberi de oxigen. La următoarele 2 categorii de vârstă, 30-34 de ani și 35-37 de ani, faptul că factorul tubar ocupă

primul loc ca și pondere poate fi explicat tot prin bolile cu transmitere sexuală ce afectează femeile tinere, cel mai des însoțite de lipsa tratamentului episoadelor acute, sau prin folosirea curetajului uterin ca și metodă contraceptivă, urmată de anexite și infertilitate secundară.

4.4. Concluzii și contribuții personale

Pacienta cu eșec recurent de implantare are media de vârstă puțin peste 35 de ani, iar categoria de vârstă cel mai des întâlnită a fost cea de 30-34 de ani. Majoritatea pacientelor au avut o greutate normală. Anomaliile uterine au fost întâlnite la un număr însemnat de cazuri, mai ales cele dobândite; cel mai frecvent am întâlnit sinechii uterine și polipi endometriali. Testul de receptivitate endometrială pe care l-am aplicat a arătat că endometrul nu a fost receptiv în jumătate dintre cazuri, iar printre cazurile cu fereastra de implantare deplasată a predominat starea prereceptivă a endometrului.

Majoritatea pacientelor cu RIF din lotul studiat pot fi încadrate la paciente cu rezervă ovariană normală. Iar în ceea ce privește cauzele de infertilitate a cuplului, pe primele 2 locuri s-au situat factorul tubar și cel masculin, în concordanță cu literatura de specialitate.

Una dintre limitările studiului prezent este faptul că, în rândul pacientelor care au efectuat o nouă procedură FIV, a predominat folosirea protocolului de stimulare ovariană lung cu agoniști de GnRH, în defavoarea protocolului scurt cu antagoniști de GnRH. Aceasta se explică prin faptul că, în anii de început ai studiului, în clinica privată unde s-au efectuat procedurile FIV predomina folosirea protocolului lung.

Referindu-mă la metodele de management al eșecului recurent de implantare, nu am obținut o asociere semnificativă statistic între efectuarea unei histeroscopii diagnostice la pacienta cu aspect normal ecografic al uterului. Totodată, analiza de corelație nu a arătat o asociere cu semnificație statistică între efectuarea unui test ERA înainte de un nou embriotransfer la o pacientă cu RIF și succesul acestui embriotransfer, infirmând astfel utilitatea testului ERA în protocolul de management al pacientei cu RIF. În ceea ce privește scratching-ul endometrial, am obiectivat o asociere semnificativă statistic de intensitate redusă între efectuarea scratching-ului în faza luteala a ciclului anterior procedurii FIV/ET sau TEC și obținerea unei sarcini clinice sau naștere cu făt viu.

Tot analiza de corelație a datelor a demonstrat că pacientele RIF supraponderale nasc copii într-o pondere mai mică decât pacientele RIF cu o greutate normală.

Luând în discuție markerii de rezervă ovariană, analiza statistică a obținut următoarele rezultate: AMH nu s-a corelat semnificativ statistic cu rata de succes a procedurilor de reproducere umană asistată la pacienta cu RIF; în ceea ce privește AFC, am demonstrat o asociere semnificativă statistic de intensitate moderată între clasificarea în funcție de AFC și numărul de copii născuți, în sensul că am înregistrat o pondere mai mare a femeilor cu fertilitate normală care au născut unul sau doi copii, comparativ cu femeile cu fertilitate redusă sau mult diminuată.

Concluzii finale

Pacienta cu eșec recurent de implantare este o pacientă tânără, de regulă cu vârsta sub 35 de ani, cu o greutate normală, ce prezintă infertilitate secundară de regulă, ce trebuie investigată pentru anomalii uterine.

Este o pacientă cu rezervă ovariană normală, ce prezintă cel mai frecvent ca și cauză de infertilitate factorul tubar sau factorul masculin.

În ceea ce privește metodele de management al eșecului recurent de implantare, studiul meu nu a confirmat utilitatea testului ERA, dar a confirmat asocierea scratching-ului endometrial cu creșterea ratei de succes a unui nou embriotransfer; totodată, studiul prezent a infirmat utilitatea histeroscopiei diagnostice la pacienta cu RIF cu aspect ecografic normal al uterului.

Alți parametri care s-au asociat semnificativ statistic cu rata de succes a unui nou embriotransfer la pacienta cu RIF sunt indicele de masă corporală și AFC.

Ca urmare, formulez următoarele recomandări pentru practica FIV:

- În cazul pacientelor cu eșec recurent de implantare supraponderale/obeze, recomand modificarea stilului de viață: dietă, activitate fizică, eliminarea sedentarismului;
- Recomand investigarea pacientei RIF pentru anomalii uterine;
- În cazul pacientelor RIF cu aspect normal ecografic al uterului, recomand să nu se efectueze de rutină histeroscopia diagnostică, pentru că nu aduce un beneficiu în ceea ce privește rata de succes a unei noi proceduri FIV/ET sau TEC;
- Recomand efectuarea scratchingului endometrial în faza luteală a ciclului anterior procedurii FIV/ET sau TEC.

4.5. Bibliografie:

1. Bergeron C, Ferenczy A, Shyamala G: Distribution of estrogen receptors in various cell types of normal, hyperplastic, and neoplastic human endometrial tissues. *Lab Invest* 58:338, 1988
2. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirel A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online* 28(1):14-38, 2014
3. El-Toukhy T, Campo R, Khalaf Y, Tabanelli C, Gianaroli L, Gordts SS, Gordts S, Mestdagh G, Mardesic T, Voboril J, Marchino GL, Benedetto C, Al-Shawaf T, Sabatini L, Seed PT, Gergolet M, Grimbizis G, Harb H, Coomarasamy A. Hysteroscopy in recurrent in-vitro fertilisation failure (TROPHY): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* 387(10038):2614-2621, 2016
4. Gardner DK and Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. in: R. Jansen, D. Mortimer (Eds.): *Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond 1999*. Parthenon, London; 1999: 378–388
5. Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 100(3):818-24, 2013
6. Mao X, Wu L, Chen Q, Kuang Y, Zhang S. Effect of hysteroscopy before starting in-vitro fertilization for women with recurrent implantation failure: A meta-analysis and systematic review. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Feb;98(7):e14075.
7. Kamath MS, Mascarenhas M, Franik S, Liu E, Sunkara SK. Clinical adjuncts in in vitro fertilization: a growing list. *Fertil Steril*. 2019 Dec;112(6):978-986.
Kamath MS, Bosteels J, D'Hooghe TM, Seshadri S, Weyers S, Mol BWJ, Broekmans FJ, Sunkara SK. Screening hysteroscopy in subfertile women and women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Apr 16;4(4):CD012856.
8. Pritts EA, Parker WH, Olive DL. Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence. *Fertil Steril* 91:1215–1223, 2009
9. Cozzolino M, Diaz-Gimeno P, Pellicer A, Garrido N. Evaluation of the endometrial receptivity assay and the preimplantation genetic test for aneuploidy in

overcoming recurrent implantation failure. *J Assist Reprod Genet.* 2020 Dec;37(12):2989-2997.

10. El-Toukhy T, Sunkara S, Khalaf Y. Local endometrial injury and IVF outcome: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 25:345–354, 2012

11. Lensen S, Osavlyuk D, Armstrong S, Stadelmann C, Hennes A, Napier E, Wilkinson J, Sadler L, Gupta D, Strandell A, Bergh C, Vigneswaran K, Teh WT, Hamoda H, Webber L, Wakeman SA, Searle L, Bhide P, McDowell S, Peeraer K, Khalaf Y, Farquhar C. A Randomized Trial of Endometrial Scratching before In Vitro Fertilization. *N Engl J Med.* 2019 Jan 24;380(4):325-334.

12. Olesen MS, Hauge B, Ohrt L, Olesen TN, Roskær J, Bæk V, Elbæk HO, Nøhr B, Nyegaard M, Overgaard MT, Humaidan P, Forman A, Agerholm I. Therapeutic endometrial scratching and implantation after in vitro fertilization: a multicenter randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2019 Dec;112(6):1015-1021.

13. van Hoogenhuijze NE, Mol F, Laven JSE, Groenewoud ER, Traas MAF, Janssen CAH, Teklenburg G, de Bruin JP, van Oppenraaij RHF, Maas JWM, Moll E, Fleischer K, van Hooff MHA, de Koning CH, Cantineau AEP, Lambalk CB, Verberg M, van Heusden AM, Manger AP, van Rumste MME, van der Voet LF, Pieterse QD, Visser J, Brinkhuis EA, den Hartog JE, Glas MW, Klijn NF, van der Meer S, Bandell ML, Boxmeer JC, van Disseldorp J, Smeenk J, van Wely M, Eijkemans MJC, Torrance HL, Broekmans FJM. Endometrial scratching in women with one failed IVF/ICSI cycle-outcomes of a randomised controlled trial (SCRaTCH). *Hum Reprod.* 2021 Jan 1;36(1):87-98.

14. Iliodromiti S, Kelsey TW, Wu O, Anderson RA, Nelson SM: The predictive accuracy of anti-Müllerian hormone for live birth after assisted conception: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Hum Reprod Update* 20(4):560-70, 2014

15. Umarsingh S, Adam JK, Krishna SBN. The relationship between anti-Müllerian hormone (AMH) levels and pregnancy outcomes in patients undergoing assisted reproductive techniques (ART). *PeerJ.* 2020 Dec 22;8:e10390.

16. Holte J, Brodin T, Berglund L, et al. Antral follicle counts are strongly associated with live-birth rates after assisted reproduction with superior treatment outcome in women with polycystic ovaries. *Fertil Steril* 96:594-9, 2011

17. Liao S, Xiong J, Tu H, Hu C, Pan W, Geng Y, Pan W, Lu T, Jin L. Prediction of in vitro fertilization outcome at different antral follicle count thresholds combined with female age, female cause of infertility, and ovarian response in a prospective cohort of 8269 women. *Medicine (Baltimore).* 2019 Oct;98(41):e17470.

- 18.** Lee Y, Kim TH, Park JK, Eum JH, Lee HJ, Kim J, Lyu SW, Kim YS, Lee WS, Yoon TK. Predictive value of antral follicle count and serum anti-Müllerian hormone: Which is better for live birth prediction in patients aged over 40 with their first IVF treatment? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018 Feb;221:151-155.
- 19.** Metello JL, Tomás C, Ferreira P. Can we predict the IVF/ICSI live birth rate? *JBRA Assist Reprod.* 2019 Oct 14;23(4):402-407.
- 20.** Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N et al: Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: An analysis of 400135 treatment cycles. *Hum Reprod* 26:1768-74, 2011