

Fertility & Sterility

Artículos Seleccionados Traducidos



FERTILITY AND STERILITY

Editor-in-Chief:

Alan H. DeCherney, M.D.
Chief, Reproductive Biology and Medicine Branch,
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

A Publication of the American
Society for Reproductive Medicine

www.fertstert.org

ISSN: 0015-0262

For more information about
submission to *Fertility & Sterility*,
please contact:

Eric Steinmetz, Managing Editor
Fertility and Sterility Editorial Office
American Society for Reproductive
Medicine

1209 Montgomery Highway
Birmingham, AL 35216-2609
Tel 205-978-5000

Email esteinmetz@asrm.org

Submit manuscripts online at
<http://ees.elsevier.com/fus>

For information about
advertising in *Fertility & Sterility*,
please contact:

Carol Clark
Elsevier
360 Park Avenue South
New York, New York 10010

Tel 212-633-3719

Fax 212-633-3620

Email cc.clark@elsevier.com



Fertility and Sterility is a monthly international journal for obstetricians, gynecologists, reproductive endocrinologists, urologists, basic scientists and others who treat and investigate problems related to infertility and other human reproductive conditions.

The Journal publishes peer-reviewed original scientific articles in clinical and laboratory research relevant to reproductive endocrinology, urology, andrology, physiology, immunology, genetics, contraception, and menopause.

Fertility and Sterility encourages and supports meaningful basic and clinical research, and facilitates and promotes excellence in professional education, in the field of reproductive medicine.

Access to www.fertstert.org is included with your paid subscription!

For more information or to order, contact

Phone:

1-800-654-2452 (U.S. and Canada)

1-314-453-7041 (other countries)

Visit:

www.us.elsevierhealth.com

Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study

Cultivo hasta blastocisto a baja concentración de oxígeno frente a cultivo convencional a elevada concentración de oxígeno. Estudio prospectivo randomizado.

Urban Waldenström, M.D., Ph.D.^a, Ann-Britt Engström, B.App.Sc.^a, Dan Hellberg, M.D., Ph.D.^{b,c}, and Staffan Nilsson, M.D., Ph.D.^{a,b,c}.

^aIn Vitro Fertilization Unit, Falun Hospital, Falun; ^bCenter for Clinical Research, Falun; and ^cDepartment of Women's and Children's Health, Uppsala, Sweden

Resumen

Objetivo: Investigar la tasa de recién nacidos tras cultivo hasta blastocisto bajo dos niveles de concentración de oxígeno (O₂).

Diseño: Estudio randomizado.

Lugar: Clínica privada de fertilización in vitro (FIV).

Pacientes: Seiscientas mujeres sometidas a FIV.

Intervenciones: Cultivo hasta blastocito bajo dos tipos de condiciones: 1) 6% de dióxido de carbono (CO₂) en aire, equivalente a 19% de O₂ (sistema de doble gas) y 2) 6% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de nitrógeno (N₂) (sistema de triple gas).

Resultados principales: Tasa de recién nacidos.

Resultados: 396 mujeres fueron incluidas en el estudio. El criterio de inclusión para el cultivo hasta blastocisto era contar con al menos cinco ovocitos fecundados. Las pacientes fueron distribuidas de forma randomizada para cultivo embrionario en sistema de triple gas (197 cultivos) y sistema de doble gas (199 cultivos). El cultivo en sistema de triple gas mostró un incremento estadísticamente significativo en la tasa de blastocitos (47,8% vs. 42,1%), en la media de blastocistos (3,8% vs. 3,3%) y la media de blastocistos criopreservados (1,7% vs. 1,1%). La media de blastocistos transferidos fue 1,2 vs. 1,3. El cultivo con sistema de triple gas incrementó la tasa de nacimientos en 10% comparado con el sistema de doble gas (42% vs. 32%, respectivamente), una diferencia estadísticamente significativa. La tasa total de gemelos fue de 4,8%.

Conclusiones: El cultivo de blastocistos a baja concentración de oxígeno (5%) ofrece mejores tasas de blastocisto y de recién nacidos frente al cultivo de blastocistos a elevada concentración de oxígeno (19%). La producción de especies reactivas de oxígeno citotóxico en el cultivo prolongado de embriones podría deteriorar la viabilidad de los blastocistos (Fertil Steril 2009; 91: 2461-5, 2009 by American Society for Reproductive Medicine).

Palabras clave: Fecundación in Vitro. Blastocistos. Oxígeno. Especies reactivas de oxígeno.

Summary

Objective: *To investigate birth rates with two oxygen (O₂) concentrations in blastocyst culture.*

Design: *Randomized trial.*

Setting: *Private in vitro fertilization (IVF) clinic.*

Patient(s): *Six hundred women undergoing IVF.*

Intervention(s): *Blastocyst culture in atmospheres with either 6% carbon dioxide (CO₂) in air, the equivalent to 19% O₂, a two-gas system; or 5% O₂, 6% CO₂, and 90% nitrogen (N₂), a three-gas system.*

Main Outcome Measure(s): *Birth rate.*

Result(s): *The inclusion criterion for blastocyst culture (at least five fertilized oocytes) was fulfilled in 396 women, randomized to 197 cultures with the three-gas system and 199 cultures with the two-gas system. The outcome with the three-gas system compared with the two-gas system showed a statistically significantly increased blastocyst rate (47.8% vs. 42.1%), mean number of blastocysts (3.8 vs. 3.3), and number of cryopreserved blastocysts (1.7 vs. 1.1). The mean number of transferred blastocysts was 1.2 versus 1.3. Culture with the three-gas system increased the relative birth rate by 10% compared with the two-gas system (42% vs. 32%, respectively), a statistically significant difference. The overall twin rate was 4.8%.*

Conclusion(s): *Blastocyst culture with low-oxygen (5%) versus high-oxygen (19%) concentration yielded a better blastocyst outcome and a marked improvement in birth rate. Generation of cytotoxic reactive oxygen species with prolonged embryo culture might deteriorate blastocyst viability. (Fertil Steril(r) 2009;91:2461-5. (c)2009 by American Society for Reproductive Medicine).*

Key words: In vitro fertilization. Blastocysts. Gas atmosphere. Oxygen.

Antes de la introducción, a final de los años 90, de los medios secuenciales para el cultivo embrionario hasta blastocisto, el desarrollo de los blastocistos era muy bajo, pese a que el empleo del co-cultivo con células de origen diverso pudieran mejorar los resultados (1). Los blastocistos permiten realizar una evaluación más correcta de la calidad embrionaria y mejorar la selección para la transferencia, proporcionando una implantación y una tasa de nacimientos más elevada. Esto podría también permitirnos realizar transferencias de un único embrión con más posibilidades, en particular cuando la criopreservación de blastocistos sobrantes de alta calidad es posible. Nuestra experiencia nos muestra que la tasa de nacimientos se incrementó con la implantación del cultivo largo de 5 días, reemplazando así a los cultivos convencionales de 2 o 3 días; y en estudios recientes randomizados, los resultados de fecundación in Vitro (FIV) han mejorado tras el cultivo de blastocistos.

El cultivo hasta blastocisto requiere experiencia y condiciones óptimas de cultivo, incluyendo el medio apropiado de cultivo. Además, el cultivo hasta blastocisto requiere una evaluación cualificada de los blastocistos y del momento adecuado de la transferencia. Los defensores de transferencia embrionaria en día 2

argumentan que la pérdida de embriones, desde la fecundación hasta estadio de blastocisto, es muy grande. La tasa de fecundación en la mayoría de los programas es de 70%, y tan sólo del 35% al 60% de los embriones en día 2 se desarrollan hasta blastocisto - dependiendo si se trata de embriones seleccionados o no seleccionados previamente al inicio del cultivo-. El medio para el cultivo prolongado debe satisfacer las necesidades nutricionales del embrión en crecimiento y además de ello, también la atmósfera circundante debe ser la apropiada.

Durante el cultivo, la atmósfera tradicional de 5% de dióxido de carbono (CO₂) en aire (con aproximadamente 20% de oxígeno [O₂]) tiene una concentración de oxígeno más alta que lo que es fisiológicamente normal en el oviducto y el útero. Se sabe que esto promueve la generación de radicales de oxígeno que son altamente citotóxicos para el embrión. Estudios en modelos animales (principalmente) han estimado que las concentraciones fisiológicas de oxígeno, en el oviducto y en el útero de diferentes especies, oscilan entre el 5% y 10%, y han comparado los resultados de diferentes atmósferas en cultivos de blastocistos. En general, se ha comparado el nivel de CO₂ en el aire con una atmósfera de 5% de CO₂, 5%

de O₂, y 90% de nitrógeno (N₂). Pese a alguna discrepancia, los resultados observados en la atmósfera de 5% de CO₂, 5% de O₂, y 90% de nitrógeno han sido prometedores.

Nuestro estudio compara el cultivo de blastocistos en 6% de CO₂ en aire (sistema de doble gas) con el cultivo en 6% de CO₂, 5% de O₂, y 89% de N₂ (sistema de triple gas). El resto de condiciones de cultivo fueron similares y las pacientes distribuidas de forma randomizada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Seiscientas pacientes fueron randomizadas en cultivo a 6% de CO₂ en aire, equivalente a 19% de O₂ (sistema de doble gas), o en cultivo a 6% de CO₂, 5% de O₂ y 89% de N₂ (sistema de triple gas), y todas a una temperatura de cultivo de 37,0° C a 37,5° C. El 5% de concentración de oxígeno se obtuvo agregando 6% de CO₂ y 70% de N₂ al aire. Las ligeras variaciones observadas en la concentración de CO₂ pudieron deberse a la calibración del pH (7,28 a 7,32). Se utilizaron el mismo tipo de incubadores de cultivo (Labrum Klimat, Stockholm, Sweden) tanto en las pacientes incluidas en el sistema de cultivo de doble gas como en las del sistema de triple gas.

El criterio de inclusión para el cultivo de blastocistos era contar, al menos, con cinco ovocitos fecundados. La randomización se realizó al comienzo de la hiperestimulación ovárica, puesto que el cultivo en sistema de triple o doble gas comenzaba inmediatamente en el momento de la inseminación. Basado en nuestras observaciones previas, nosotros estimamos que tan sólo unas 400 de las 600 pacientes randomizadas podrían cumplir los criterios de inclusión (al menos cinco ovocitos fecundados) y algunas pacientes adicionales no participarían en el estudio por otro tipo de razones. Estudio ciego randomizado para el facultativo. La estimulación ovárica controlada y obtención de ovocitos fueron realizadas de acuerdo al protocolo "largo" de GnRh estándar, o en algunos casos con un protocolo estándar con antagonistas. Para la estimulación ovárica, se utilizó la hormona folículo estimulante recombinante (FSH) de acuerdo a protocolos previamente ya descritos. Los cultivos secuenciales de embriones fueron realizados con medio Blast Assist System (MediCult, Jyllinge, Denmark). Después de valorar la fecundación, los embriones fueron transferidos a medio 1 en día +1 y a medio 2 en día +3. El medio fue reemplazado nuevamente en día 4 por medio fresco 2. No se cultivaron más de cinco embriones juntos y el cultivo se realizó en placas sin aceite.

En la transferencia embrionaria, los clínicos recomendaban la transferencia de un único blastocisto. Se transfirieron dos blastocistos en algunos casos excepcionales como pacientes de edad avanzada, con varios fracasos previos de FIV, o cuando tan sólo se disponía de blastocitos de baja calidad (n= 96, 26%). En el estudio solamente se incluyeron transferencias de blastocistos en fresco. El hatching asistido fue realizado, con solución de tiroides, cuando se observó una zona pelúcida gruesa y de acuerdo a la experiencia de los embriólogos. Los blastocistos sobrantes de buena calidad fueron congelados en medio de congelación de Medi Cult. La transferencia embrionaria fue realizada en todos los casos en los que se contaba, al menos, con una mórula de buena calidad para transferir.

La calidad de los blastocitos fue valorada de acuerdo a los criterios de Schoolcraft y col. (14). Un blastocito de buena calidad tenía que estar completamente expandido, con el volumen del blastocelo más grande que en el embrión temprano, con la masa celular interna compactada, y la masa celular externa (trofoectodermo) formada por muchas células constituyendo un epitelio cohesivo, y no necesariamente iniciando Hatching.

Los resultados fueron analizados en el programa estadístico JMP 3.1 (SAS Institute, Cary, NC). El test de Chi-square (ratio de probabilidad) fue utilizado para las variables nominales y la t-test para variables continuas. Los análisis multifactoriales, por regresión logística, (logaritmo del test de probabilidad), fue utilizado cuando había que ajustar posibles factores de confusión. No se requirió consentimiento ético puesto que ambos tipos de cultivo ya se empleaban de rutina al inicio del estudio. No hubo conflictos de interés.

RESULTADOS

Al comenzar la hiperestimulación ovárica, 600 pacientes fueron randomizadas a cultivo en sistema doble gas o sistema triple gas. Como esperábamos, 173 mujeres no reunieron los criterios de inclusión del estudio porque contaban con menos de cinco ovocitos fecundados. Otras 31 pacientes se excluyeron del estudio porque se decidió criopreservar todos los embriones y no realizar transferencia de embriones en fresco.

Del resto de pacientes, 199 fueron asignadas a cultivo en el sistema de doble gas y 197 en el sistema de triple gas. Las características de ambos grupos de pacientes se muestran en la Tabla 1. La edad, número de ciclos previos de FIV, número de ovocitos obtenidos, métodos de inseminación, tasa de fecundación y

Tabla 1
Características de mujeres con ovocitos cultivados en sistema doble gas o triple gas

	Doble gas ^a	Triple gas ^b	P valor
Edad media (años)	34,0	33,5	.34
Rango de ciclos de FIV	2,15	2,01	.40
Número de ovocitos obtenidos	11,34	11,78	.26
Nº de inyección espermática intracitoplasmática (%)	96 (48,2)	97 (49,5)	.84
Nº de TESE/PESA (%) ^c	5 (2,51)	4 (2,04)	.75
Ovocitos fecundados a las 24 horas	8,01	8,13	.66
Tasa de fecundación (%)	72,5	71,2	.40
Número de embriones transferidos	1,29	1,23	.18

^a6% CO₂ en aire

^b5% O₂, 6% CO₂, 89% N₂

^cExtracción de espermatozoides/ aspiración percutánea de espermatozoides.

Waldenström. *Oxygen tension in blastocyst culture. Fertil Steril* 2009.

número de embriones transferidos fueron similares en ambos grupos.

No se obtuvieron blastocistos en 13 pacientes (6,5%) en el grupo de doble gas y en 14 pacientes (7,1%; no estadísticamente significativo) en el sistema de triple gas. El cultivo del sistema en triple gas tuvo una correlación estadísticamente significativa con el mayor número de blastocistos y la tasa de ovocitos fecundados que se desarrollaron a blastocistos (Tabla 2). En las pacientes cultivadas en sistema de triple gas, se observó una mayor calidad blastocística, pero no se observó diferencia significativa ni en la calidad total del trofoectodermo ni en la masa celular interna. Hubo un aumento altamente significativo (casi 50%) en el número de blastocitos de buena calidad disponibles para criopreservar al utilizar el sistema de triple gas.

Los resultados de la fecundación in vitro en términos de niveles de gonadotropina coriónica humana

(hCG), embarazos viables, y nacimientos fueron todos estadísticamente significativos en las pacientes en las que se empleó el sistema de cultivo triple gas (Tabla 3). La tasa de nacimiento por embrión transferido fue de 42,1% para el sistema de triple gas frente a 32,2% para el sistema de doble gas.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron una tasa de nacimientos considerable y estadísticamente significativa más alta (más del 10%) al utilizar el sistema de triple gas frente al sistema de doble gas (equivalente a 19% de O₂). Las tasas de fecundación fueron similares en los dos grupos, pero en el sistema triple gas se observaron una tasa de blastocisto y calidad blastocística (juzgado por el número de blastocistos de buena cali-

Tabla 2
Resultados de cultivo de embriones en sistema doble gas o triple gas

	Doble gas ^a (n, %)	Triple gas ^b (n, %)	Valor P
Número medio de blastocistos	3,33	3,81	.03
Desarrollo de blastocistos por número de ovocitos fecundados (%)	42,1	47,8	.02
Cuatro más blastocistos	81 (40,7)	100 (50,8)	.04
Número medio de blastocistos criopreservados	1,13	1,66	.002
Blastocistos de alta calidad ^c	139 (74,7)	148 (80,9)	.16

^a6% de CO₂ en aire

^b5% de O₂, 6% de CO₂, 89% de N₂

^cBlastocistos de buena calidad donde hubo al menos un blastocisto transferido.

Waldenström. *Oxygen tension in blastocyst culture. Fertil Steril* 2009.

Tabla 3

Resultados de cultivos de blastocistos en sistema de doble gas o triple gas

	Doble gas ^a (n, %)	Triple gas ^b (n, %)	Valor P
Test de embarazo positivo	77 (38,7)	112 (56,9)	.0003
Abortos <12 semanas de gestación	10 (5,4)	17 (9,3)	.15
Embarazos viables	70 (35,2)	90 (45,7)	.03
Nacimientos	64 (32,2)	83 (42,1)	.04
Embarazos gemelares ^c	2 (2,9)	5 (6,3)	.40

^a6% CO₂ en aire

^b5% O₂, 6% CO₂, 89% N₂

^cGemelos por embarazo viable.

Waldenström. *Oxygen tension in blastocyst culture. Fertil Steril* 2009.

dad disponibles para criopreservar) significativamente superiores. También se observaron más embarazos bioquímicos, embarazos viables y nacimientos bajo cultivo en sistema de triple gas. Una hipótesis, que podría dar explicación a estos resultados, sería el continuo aumento de las especies reactivas de oxígeno (ej. radicales libres) en cultivos de 5 días de duración. Este hecho aumentaría con el incremento de la tensión de O₂. Catalizadores de la producción de especies reactivas de oxígeno, como el superóxido (O₂⁻), hidroxiperoxidasa (H₂O₂), y radicales hidroxilos OH, podrían ser xantina oxidasa, flavina, mononucleótidos, tiaminas, acridinas y fenacinas (15). Noda y col. (16) encuentran, en estudios retrospectivos, que la incorporación al medio de cultivo de hipoxantina, sulfato de cobre (II) (SO₄Cu), sulfato de zinc (SO₄Zn), y sulfato de hierro (SO₄Fe) mejoran las tasas de blastulación al comparar esos cultivos con los sistemas de cultivo utilizados previamente. Fujitani et al. (11) generaron radicales de oxígeno libre en el medio de cultivo de embriones bovinos y de esa manera suprimieron la blastulación. Dalyit et al. (17) estudiaron la producción de especies reactivas de oxígeno, durante el cultivo embrionario y encontraron un aumento gradual hasta el estadio de mórula.

Antes de evaluar los estudios acerca de la posible importancia de la concentración de O₂, se debería proceder a considerar algunos requisitos. Si no se encuentra diferencia cuando se realiza cultivo de día +2 a día +3, esto indicaría que la concentración es más importante, o quizá solo sea importante, en el cultivo hasta blastocisto. Además, los estudios deberían ser randomizados, utilizar un medio libre de células (preferentemente secuencial), reportar el número y la calidad de blastocistos, y tener como objetivo final tasa de nacimientos o al menos tasa de embarazos en curso.

Pocos estudios humanos, si es que algunos, han comparado tasas de embarazo o nacimientos con diferentes concentraciones de oxígeno. Los estudios que compararon concentraciones de oxígeno en día +2 y +3 de transferencia no mostraron diferencias estadísticamente significativas (18-21). Dos estudios anteriores de cultivo de blastocitos (21, 22) utilizaron embriones supernumerarios después de día +2 y +3 de transferencia. Behr y col. (21) cultivaron con sistema de doble gas o triple gas hasta que se procedió a valorar la fecundación. A continuación, todos los embriones fueron cultivados en 5% de CO₂ en aire hasta el estadio de blastocisto. Sus resultados no fueron relevantes, puesto que se utilizó la misma tensión de durante la fase crítica de desarrollo del blastocito. Gardner y col. (22) publicaron el cultivo hasta blastocisto de 49 embriones humanos y encontraron más células en blastocistos cultivados con el sistema triple gas que con el sistema doble gas.

En un estudio reciente, Kea y col. (23) confirmaron que disminuir la concentración de oxígeno no afectaba los resultados cuando la transferencia se realizaba en día +3 de desarrollo embrionario. En ese mismo estudio 22 mujeres sometidas a transferencia de blastocistos fueron randomizadas a cultivos en 5% o 20% de O₂. Se transfirió una media de 1,9 blastocistos, y la tasa de embarazo fue de 70% con 5% de oxígeno frente a 33% con 20% de oxígeno. La diferencia no fue estadísticamente significativa, posiblemente debido a la pequeña población en estudio.

Los estudios en humanos son escasos, pero se han realizado numerosos estudios en animales. A pesar de no ser comparable, se pueden sacar algunas conclusiones. Entre las especies utilizadas en esas investigaciones encontramos ratones (24-27), cerdos (12), gatos (28), cabras (29), ovejas y vacas (30), y embriones

bovinos (11, 15, 31-35). En dos estudios anteriores en ratones, Harlow y Quinn (25, 26) publicaron, tras comparar concentraciones entre 0 a 40%, que la concentración de oxígeno óptima para el cultivo de blastocistos era entre 2,5% a 5,0%. Los embriones fueron obtenidos en día +1 hasta día +4 en "ratones superovuladores" embarazados después de concepción natural. Las concentraciones de oxígeno parecían ser más cruciales cuando los embriones eran cultivados durante 4 días, comparando con los resultados obtenidos tras tiempos más cortos de cultivo (25). Los embriones cultivados bajo 5% de O₂ tuvieron más células, pero su tasa de embarazo y viabilidad para el desarrollo de fetos después de la transferencia embrionaria fue similar que las obtenidas con concentraciones más elevadas de O₂ durante el cultivo. El tamaño de la muestra era pequeño (26).

Aunque Gardner and Lane (27) se centraron en el efecto del medio único, ellos también encontraron que el desarrollo de blastocistos aumentó de 30% (20% O₂) a 62% (7% O₂). Más recientemente, Adam y col. (24) confirmaron en ratones el efecto positivo de bajar la concentración de O₂ en el desarrollo de blastocistos pero no en la tasa de fecundación.

El número de células de los blastocistos mejoraba cuando los embriones porcinos se cultivaron bajo 5% de O₂ frente a 20% O₂ (12); sin embargo, la tasa de blastulación no varió significativamente al emplear el sistema de doble y triple gas en embriones de gato (22% vs. 34%). Batt y col. (29) estudiaron los cultivos de blastocistos en embriones de cabras con diferentes fuentes de proteínas en el medio bajo 7% y 20% de O₂. La tasa de blastocisto con un medio de cultivo aumento del 29% al 80% con 7% de concentración de O₂. Los investigadores notaron que "era necesaria alguna precaución al evaluar los experimentos en los que se marcaba como objetivo el desarrollo morfológico" (ej. en vez de viabilidad después de transferencia).

Thompson y col. (30) sacrificaron superovuladoras (ovejas y vacas) inseminadas de forma natural y con embriones de 2 a 8 células. Los embriones fueron cultivados in vitro durante 5 días bajo nueve concentraciones diferentes de O₂, de 0 a 20% con un medio simple sin co-cultivo. El desarrollo hasta estadio de mórula y el recuento de células fue superior bajo concentraciones de 4% y 8% de O₂ frente a concentraciones de 20% de O₂. Seis estudios en FIV de oveja mostraron mejores resultados con cultivo bajo sistema triple gas que sistema de cultivo doble gas (11, 15, 31-33, 35). Takahashi y col. (15) utilizaron medio sintético de fluido de oviducto en seis concentraciones de 2,5% a 20,0% de O₂. La concentración de O₂ óptima

fue de 5% y la tasa de blastulación fue de 25%, comparado con una tasa de 11% con 20% de O₂. El mismo medio de cultivo fue empleado en otro estudio (31), encontrando que el desarrollo de blastocistos era de 26% frente a 10%. Cuando las células epiteliales del oviducto fueron incorporadas al medio, la atmósfera de cultivo no tuvo tanta importancia. Takahashi y Kanagawa (32) mostraron, como en muchos otros estudios, que las tasas de fecundación no variaba con la concentración de O₂, pero la blastulación fue mayor en cultivo triple gas que en doble gas en medio de Tiroides (34% vs. 24%). En otro estudio se utilizó un medio de cultivo de embriones modificado, obteniendo sólo 2% de desarrollo de blastocistos en 20% de O₂, frente a 23% en 5% de O₂ (34). El estudio de Rizos y col. (35) muestra que con el cultivo de embriones bovinos, en fluido sintético del oviducto durante 8 días, se obtiene una tasa de blastocisto de 31% en sistema triple gas y 23% en sistema doble gas.

Finalmente, Fujitani y col. (9) emplearon un medio libre de células (TCM119) para cultivo embrionario y compararon el cultivo triple y doble gas. En ausencia de la especie reactiva de oxígeno: residuo hipotaurina, sólo 19% de los embriones alcanzaron el día +8 en estadio de blastocisto, frente al 38% en una concentración óptima de hipotaurina y 20% de concentración de O₂. La tasa de blastocistos con 5% de concentración de O₂ fue de 53%, independientemente de la adición de hipotaurina.

Los resultados de estos modelos animales son a veces difíciles de interpretar, ya que se comparan simultáneamente diferentes medios libres de células con diferentes concentraciones de oxígeno. Hay que considerar que la mayoría de los estudios son más bien antiguos, y los medios secuenciales modernos no estaban disponibles. En general, los ovocitos se obtuvieron después del sacrificio, no se realizó una randomización apropiada, no se emplearon medios secuenciales, y el objetivo final era el desarrollo de blastocistos y no el embarazo. Sin embargo, un hallazgo común fue que en presencia de co-cultivo con otras células no hubo diferencias en los blastocistos obtenidos entre el 5% y 20% de concentraciones de O₂ (14, 29, 31-33). En otro estudio (31) incluyendo sólo medios con co-cultivo se alcanzaron mejores resultados con 20% de O₂. Esas otras células presentes en el co-cultivo podrían haber inhibido la producción de especies reactivas de oxígeno.

Todos esos estudios previos, realizados en animales, han tenido muchas carencias y resulta difícil compararlos con nuestro estudio puesto que no abarcaban el desarrollo más allá del estadio de blastocisto. No evidencian que una alta tasa de blastulación conduzca a nacimientos, el objetivo natural de la FIV

en humanos, como demuestra nuestro estudio. Sin embargo, los estudios en animales permitieron conocer y mejorar los resultados de los cultivos hasta blastocito a baja concentración de O₂.

Nuestro estudio es randomizado, prospectivo e incluye un gran número de casos. La tasa de fecundación no varió entre alta o baja concentración de O₂, confirmando las teorías de las especies reactivas de oxígeno altamente citotóxicas, lo cual es importante en cultivos hasta día +5 pero no en cultivos cortos. En nuestro estudio, a excepción de las características morfológicas, cada variable valorada desde el desarrollo de blastocisto hasta el nacimiento, ha mostrado la superioridad del cultivo en sistema triple gas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Menezo Y, Veiga A, Benkhalifa M.:** Improved methods for blastocyst formation and culture. *Hum Reprod* 1998; 13(Suppl 4): 256-65.
2. **Gardner DK, Lane M.:** Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3: 367-82.
3. **Nilsson S, Waldenström U, Engström A-B, Hellberg D.:** Promising results with 306 single blastocyst transfers. *Fertil Steril* 2005; 83: 1849-51.
4. **Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P.:** In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *New Engl J Med* 2006; 354: 1139-46.
5. **Sakkas D, Gardner DK.:** Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17: 283-8.
6. **Langley MT, Marek DM, Gardner DK, Doody KM, Doody KJ.:** Extended embryo culture in human assisted reproduction. *Hum Reprod* 2001; 16: 902-8.
7. **Shapiro B, Richter KS, Harris DC, Daneshmand S.:** Influence of patient age on the growth and transfer of blastocyst-stage embryos. *Fertil Steril* 2002; 77: 700-5.
8. **Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R.:** Transfer of blastocysts and morulae on day 5. *Fertil Steril* 2004; 82: 327-33.
9. **Trokoudes KM, Minbattiwalla MB, Kalogirou L, Pantelides K, Mitsingas P, Sokratous A, et al.:** Controlled natural cycle IVF with antagonist use and blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 685-9.
10. **Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, Royere D.:** Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study on 4042 embryos. *Hum Reprod* 2007; 22: 1973-81.
11. **Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, Nishimura K, Yamada M, Utsumi K.:** Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro-produced bovine embryos. *J Anim Sci* 1997; 75: 483-9.
12. **Booth PJ, Holm P, Callesen H.:** The effect of oxygen tension on porcine embryonic development independent on embryo type. *Theriogenology* 2004; 63: 2040-52.
13. **Waldenström U, Hellberg D, Nilsson S.:** Low-dose aspirin in a short regimen as standard treatment in in vitro fertilization-a randomized, prospective study. *Fertil Steril* 2004; 81: 1560-4.
14. **Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR.:** Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril* 1999; 72: 604-9.
15. **Takahashi Y, Hishinuma M, Matsui M, Tanaka H, Kanagawa H.:** Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 897-902.
16. **Noda Y, Goto Y, Umaoka Y, Shiotani M, Nakayama T, Mori T.:** Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertil Steril* 1994; 62: 1022-7.
17. **Dalvit GC, Cetica PD, Pintos LN, Beconi MT.:** Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell* 2005; 29: 209-12.
18. **Feichtinger W, Kemeter P, Szalay S.:** The Vienna program of in vitro fertilization and embryo transfer-a successful clinical treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1983; 15: 63-70.
19. **Dumoulin JCM, Vanvuchelen RCM, Land JA, Pieters MHEC, Geraedts JPM, Evers JLH.:** Effect of oxygen concentration on in vitro fertilization and embryo culture in the human and the mouse. *Fertil Steril* 1995; 63: 115-9.
20. **Dumoulin JCM, Meijers CJJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JPM, Evers JLH.:** Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod* 1999; 14: 465-9.
21. **Behr B, Pool TB, Milki AA, Moore D, Gebhardt J, Dasig D.:** Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. *Hum Reprod* 1999; 14: 454-7.
22. **Gardner DK, Lane M, Johnson J, Wagley L, Stevens J, Schoolcraft WB.:** Reduced oxygen tension increases blastocyst development, differentiation and viability [abstract]. *Fertil Steril* 1999; 72(Suppl 1): S30-1.
23. **Kea B, Gebhardt J, Watt J, Westphal LM, Lathi RB, Milki AA, Behr B.:** Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007; 87: 213-6.
24. **Adam AA, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M.:** Effects of oxygen tension in the gas atmosphere during

- in vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro culture on the efficiency of in vitro production of mouse embryos. *Jpn J Vet Res* 2004; 52: 77-84.
25. **Quinn P, Harlow GM.:** The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool* 1978; 206: 73-80.
 26. **Harlow GM, Quinn P.:** Foetal and placental growth in the mouse after preimplantation development in vitro under oxygen concentrations of 5 and 20%. *Aust J Biol Sci* 1979; 32: 363-9.
 27. **Gardner DK, Lane M.:** Alleviation of the "2-cell block" and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod* 1996; 11: 2703-12.
 28. **Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE.:** Influence of temperature and gas atmosphere on in-vitro fertilization and embryo development in domestic cats. *J Reprod Fertil* 1991; 92: 377-82.
 29. **Batt PA, Gardner DK, Cameron AW.:** Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev* 1991; 3: 601-7.
 30. **Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnely PE, Tervit HR.:** Effect of oxygen concentration on in vitro-development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 573-8.
 31. **Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR.:** Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil* 1991; 92: 125-31.
 32. **Takahashi Y, Kanagawa H.:** Effect of oxygen concentration in the gas atmosphere during in vitro insemination of bovine oocytes on the subsequent embryonic development in vitro. *J Vet Med Sci* 1998; 60: 365-7.
 33. **Kaidi S, Donnay I, Van Langendonck A, Dessy F, Massip A.:** Comparison of two co-culture systems to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification. *Anim Reprod Sci* 1998; 52: 39-50.
 34. **Lim JM, Reggio BC, Godke RA, Hansel W.:** Development of in-vitro- derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *Hum Reprod* 1999; 14: 458-64.
 35. **Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P.:** Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 2001; 56: 1-16.

Impact of blastocyst transfer on offspring sex ratio and the monozygotic twinning rate: a systematic review and meta-analysis

Impacto de la transferencia de blastocitos en la tasa de sexo de los recién nacidos y la tasa de gemelos monocigóticos: una revisión sistemática y metaanálisis

Hye Jin Chang, M.D., Ph.D.,^a Jung Ryeol Lee, M.D.,^{a,b} Byung Chul Jee, M.D., Ph.D.,^a Chang Suk Suh, M.D., Ph.D.,^{a,b} and Seok Hyun Kim, M.D., Ph.D.^b

^aDepartment of Obstetrics and Gynecology, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam; and ^bDepartment of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, South Korea

Resumen

Objetivo: *determinar la tasa de sexo y el riesgo de gemelos monocigotos (MZT) después de la transferencia de blastocito comparado con la transferencia de embriones (ET) en estadio de división en ciclos de FIV en fresco.*

Diseño: *revisión sistemática y meta-análisis.*

Lugar: *Hospital universitario para medicina reproductiva y FIV.*

Paciente(s): *resultado de todos los reportes desde enero de 1995 a noviembre de 2007 de mujeres que realizaron FIV en fresco. Se incluyó la tasa de sexo de 2,587 recién nacidos y la tasa de MZT en 40,917 ciclos.*

Intervención(s): *Estadio de blastocito o de división para transferencia de embriones.*

Principal resultado obtenido: *tasa de sexo y MZT.*

Resultado(s): *Se realizó un meta-análisis utilizando cuatro estudios para tasa de sexo y nueve estudios para MZT. Los resultados del meta-análisis utilizando un modelo de efecto fijo mostraron una mayor tasa varón/mujer después de la transferencia de blastocito comparado con ET estadio de división (odds ratio [OR] 1.29, 95% intervalo de confianza [CI] 1.10-1.51), y esta diferencia fue estadísticamente significativa. El riesgo de MZT después de la transferencia de blastocitos fue significativamente mayor en comparación con la transferencia de embriones en estadio de división (OR 3.04, 95% CI 1.54-6.01).*

Conclusión(es): *los datos combinados en este meta-análisis sugieren que la transferencia de blastocitos parece estar asociado con una tasa de sexo inclinada a favor de varones y un riesgo incrementado de MZT. Los clínicos deberían dar esta información a sus pacientes infértiles en espera de transferencia de blastocitos.*

Palabras clave: Blastocyst. Cleavage stage. Sex ratio. Monozygotic twin. Embryo transfer.

Summary

Objective: *To determine the sex ratio and risk of monozygotic twinning (MZT) after blastocyst transfer compared with cleavage-stage embryo transfer (ET) in fresh IVF cycles.*

Design: *Systematic review and meta-analysis.*

Setting: *University hospital center for reproductive medicine and IVF.*

Patient(s): *Results of all reports from January 1995 to November 2007 with women undergoing non-donor fresh IVF. The sex ratio of 2,587 offspring and MZT rate in 40,917 cycles were included.*

Intervention(s): *Cleavage or blastocyst stage for embryo transfer.*

Main Outcome Measure(s): *Sex ratio and rate of MZT.*

Result(s): *A meta-analysis was performed using four studies for sex ratio and nine studies for MZT. The results of the meta-analysis using a fixed effect model demonstrated a higher male-female ratio after blastocyst transfer compared with cleavage-stage ET (odds ratio [OR] 1.29, 95% confidence interval [CI] 1.10-1.51), and this difference was statistically significant. The risk of MZT after blastocyst transfer was significantly higher compared with cleavage-stage ET (OR 3.04, 95% CI 1.54-6.01).*

Conclusion(s): *The combined data presented in this meta-analysis suggest that blastocyst transfer appears to be associated with a sex ratio skewed in favor of males and an increased risk of MZT. The clinicians should provide this information to their infertility patients awaiting blastocyst transfer. (Fertil Steril(r) 2009;91:2381-90. (c)2009 by American Society for Reproductive Medicine.)*

Key words: Blastocyst. Cleavage stage. Sex ratio. Monozygotic twin. Embryo transfer.

El desarrollo de sistemas de medios de cultivos secuenciales disponibles comercialmente continúa aumentando nuestra habilidad para desarrollar embriones humanos al estadio de blastocito sin cocultivo. La transferencia de blastocitos ofrece varias ventajas: sincronización de embriones con endometrio y selección de embriones de buena calidad que han tenido un buen desarrollo bajo control genómico embrionario. Se ha reportado que el transfer de blastocitos incrementa las tasas de implantación comparado con las transferencias en día 2 o día 3 (1). Además esto podría tener el beneficio adicional de una reducción de nacimientos múltiples, siempre y cuando se transfieran no más de dos o incluso un blastocito (2). Aunque estas ventajas han sido enfatizadas, ha habido cierta preocupación en los efectos adversos de la transferencia de blastocitos. Hay posibilidad de cancelación de ciclo debido a no tener embriones para transferir (3), fallo de tener embriones extras que puedan ser criopreservados para uso futuro (4), aumento de gemelos monocigotos (MZT), y una tasa de sexo alterada en los recién nacidos (5).

Aunque la mayoría de los estudios de transferencia de blastocitos presentan sus ventajas (ej.: aumento en las tasas de implantación y tasas de embarazo) se debe considerar las limitaciones, que son, el impacto de la transferencia de blastocitos en la tasa de sexo

alterada en recién nacidos vivos y el posible riesgo aumentado de MZT.

Un exceso de varones se ha reportado en recién nacidos después de FIV comparado con embarazos naturales (6).

Este desequilibrio en la tasa de sexo se puede deber a la observación que se ha documentado un desarrollo más veloz en embriones masculinos comparado con los embriones femeninos en especies animales (7-9) y humanos (10). Un reporte clínico demostró más varones después de transferencias de blastocitos comparado con embarazo natural (5). Sin embargo, estudios subsecuentes fallaron en demostrar una relación hombre/mujer (M/F) incrementada después de la transferencia de blastocito comparada con la transferencia en estadio de división (11-13), excepto en un reporte reciente (14). Es probable que el número bajo de casos de estos estudios anteriores no haya permitido alcanzar una significancia estadística.

Otro asunto con respecto a la transferencia de blastocitos es el posible incremento en las tasas de MZT. Después de la primera documentación de un incremento en las tasas de MZT con transferencia de blastocito (15), no se ha establecido la incidencia precisa. Numerosos investigadores han reportado un incremento en la incidencia de MZT después de transferencia de blastocito comparado con la transferencia

clásica de embriones en estadio de división, pero los resultados son de alguna manera inconsistentes (16-18). Debido a que MZT es un evento excepcional, y que varios estudios anteriores carecían de poder estadístico para mostrar un incremento en la incidencia de MZT con transferencia de blastocito, no está claro si la frecuencia aumentada de MZT es un descubrimiento estadísticamente significativo. Aunque estudios individuales pueden carecer de poder estadístico de mostrar resultados significantes, un meta-análisis (datos combinados) puede ser utilizado para demostrar una diferencia estadística.

Sin embargo, hay pocos estudios de alta calidad con gran cantidad de casos para resolver esta pregunta sobre la transferencia de blastocito. Además, solo se han reportado unos pocos estudios prospectivos randomizados y controlados (RCTs) en el género de los recién nacidos y MZT. Esto puede ser atribuido a la baja incidencia de MZT; por ello, no se ha utilizado ningún estudio randomizado para resultados de MZT en el presente meta-análisis.

Hemos realizado un meta-análisis para determinar si la tasa de sexo en recién nacidos y el riesgo de MZT se incrementan después de la transferencia de blastocito comparado con ET de estadio de división en ciclos frescos de FIV en no-donantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia de búsqueda

Para el propósito de esta revisión sistemática, se realizó una búsqueda informatizada en la literatura de la base de datos electrónicos de National Library of Medicine and National Institutes of Health (Pubmed), Embase, y Cochrane Controler Trials Register (CENTRAL), independientemente por dos de los autores. La búsqueda de literatura fue conducida en un intervalo de tiempo entre 1995, cuando se publicó el primer estudio que describe el éxito de cultivo de blastocito y su aplicación clínica a FIV (19), y noviembre de 2007. Se seleccionaron los estudios que respondieran la siguiente pregunta: ¿está la transferencia de blastocito asociada con un mayor número de hijos varones y un riesgo incrementado de MZT comparado con transferir embriones en estadio de división en ciclos FIV-ET en humanos?

Se realizó una búsqueda de literatura informatizada utilizando los términos de texto libre "day two or day 2," "day three or day 3," "cleavage," "day five or day 5," "day six or day 6," y "blastocyst", como sujeto médico encabezando bajo "assisted conception" or "IVF" or

"ovarian stimulation" or "embryo transfer". Los encabezados de los estudios fueron limitados a reportes en "humanos". Y fueron buscadas a mano las referencias de los artículos obtenidos y otras revisiones junto con procedimientos de conferencias relevantes para identificar otros estudios potencialmente elegibles que pudieran ser perdidos en la búsqueda inicial. Excluimos literatura en lenguaje que no fuera inglés debido a la accesibilidad y la habilidad en leer. No existió un lazo de financiación con alguna entidad comercial de los que sus productos son descritos, revisados, evaluados o comparados en este estudio.

Selección de estudios

Los criterios de inclusión para estudios fueron establecidos antes de la búsqueda de literatura y fueron los siguientes: 1) estudios con datos comparativos en tasa de sexo o tasa de MZT en infantes nacidos después transferir blastocito y embriones en estadio de división en ciclos de FIV frescos en humanos; y 2) publicación del estudio en una revista con revisión por pares. Se consideraron también estudios no randomizados retrospectivos si se comparaban las tasas de sexo y MZT y si las tasas de MZT fueron específicamente separadas de gestaciones múltiples en la población de tecnología reproductiva artificial (TRA).

Estudios identificados

Se identificaron un total de 1,555 estudios potencialmente relevantes, y 775 estudios fueron excluidos después de limitar a "human" y "assisted conception" o "IVF" u "ovarian stimulation" o "embryo transfer". Los 780 estudios restantes fueron tamizados con filtros como "sex ratio" u "outcomes" en la tasa de sexo, "monozygotic twin" o "monozygosity" o "twin" en tasas de MZT. Después de tamizar los títulos y abstracts se inspeccionaron 10 documentos potencialmente elegibles para tasa de sexo y 15 estudios para MZT como texto completo. La búsqueda literaria consiguió diez estudios sobre la tasa de sexo en infantes nacidos después de transferencia de blastocito que se adecuaron a los criterios del primer estudio. Una evaluación posterior identificó cinco estudios basados en los títulos y abstracts de los estudios y/o evaluación de manuscritos completos que describían el género de los infantes nacidos resultantes de transferencia de blastocito.

Cinco abstracts se excluyeron debido a la ausencia de proceso de revisión por pares y por la longitud del artículo original completo (15, 20-23). Se excluyeron dos reportes sobre el desequilibrio de la tasa de sexo

después de transferencia de blastocito porque no había datos comparativos entre la transferencia de blastocito versus embriones en estadio de división (5, 24). Se excluyeron estudios si no se describía la frecuencia de MZT en alguna de las transferencias de blastocitos o embriones en estadio de división (25-30). Un ensayo prospectivo fue excluido porque la frecuencia de pares monocoriónicos no fue especificada en los embarazos de FIV (28). Se excluyeron tres estudios prospectivos porque no documentaron eventos de MZT, y por ello el riesgo de MZT asociado a transferencia de blastocito podría no ser comparada con la transferencia de embriones en estadio de división (31-33). El método funnel plot para las tasas de MZT demostró que los estudios fueron distribuidos incluso a través del gráfico, sugiriendo una ausencia de sesgo de publicación.

Extracción de datos

Los siguientes datos fueron extraídos de cada estudio elegible: demográfico (tipo de estudio, fecha de citación, período de estudio, número de pacientes incluidos, número de ciclos realizados), datos de procedimiento (tipo de regulación en descenso (down regulation) y protocolo de estimulación ovárica, tipo de gonadotropina administrada, señal de maduración ovocitaria final, tipo de fertilización, día de ET, número de embriones transferidos, medio de cultivo utilizado, definición de MZT), y resultados (tasa M/F de infantes nacidos, tasa de MZT) como figura en las Tablas 1 y 2.

Se extrajeron los datos de FIV en fresco de estudios que describen múltiples procedimientos de TRA (34), y se excluyeron del análisis los datos de ciclos de frizado y descongelado y ciclos de donantes.

Parámetros de resultados

El primer parámetro de resultado evaluado fue el ratio M/F de infantes nacidos y las tasas de MZT en embarazos resultados de ciclos de FIV en fresco en humanos.

Para el meta-análisis, la tasa de sexo de infantes fue definida como el número de infantes masculinos/número de infantes femeninos (tasa M/F). La tasa de MZT fue definida como el número de MZT/número de embarazos clínicos. El género de los recién nacidos resultado de los ciclos de FIV fue informado por cada pareja. En la mayoría de los estudios, se diagnosticó MZT cuando más de un feto con actividad cardíaca positiva se observó dentro del mismo saco gestacional, o habían más sacos gestacionales que

el número de embriones transferidos. Además, los resultados fueron confirmados por una nueva ecografía dos semanas después; en algunos estudios la información de seguimiento para el resto del embarazo y parto estaba disponible.

Datos de síntesis cuantitativos

Los datos dicotomizados elegibles para meta-análisis en cada estudio fueron expresados como un odds ratio (OR) con 95% de intervalo de confianza (CI). Estos resultados fueron combinados para meta-análisis con el uso del método Mantel-Haenzel con el modelo de efecto fijo y el método de DerSimonian y el método Laird cuando se utilizó el modelo de efectos random.

Se realizó un meta-análisis utilizando el Software Revman (versión 4.2 para Windows; Nordic Cochrane Center, Copenhagen, Dinamarca). Se evaluó las variaciones de estudio a estudio con la estadística χ^2 (la hipótesis examinada fue que los estudios son todos bajos para la misma población, ejemplo: de una población con el mismo tamaño efecto). Fue presentado un modelo de efectos fijo donde no había heterogeneidad, sin embargo en la presencia de heterogeneidad significativa se aplicó un modelo de efectos random. Un valor para P de $< .05$ se consideró como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Cuatro estudios que examinaban la tasa de sexo (11-14) y nueve estudios que reportaban gemelos monocigotos (16-18, 34-39) completaban los criterios de inclusión y fueron incluidos para el meta-análisis. Hubo cuatro estudios retrospectivos que comparaban la tasa de sexo y cinco estudios retrospectivos observacionales y cuatro RCTs que comparaban la incidencia de MZT (Tabla 1).

Los ratios M/F fueron consistentemente mayores después de transferencia de blastocitos que después de transferencia de embriones en estadio de división en todos los cuatro estudio, pero solo se consiguió una significancia estadística en un reporte (14). De los 1,102 infantes nacidos como resultado de transferencia de blastocito, 626 fueron varones y 476 mujeres, dando una tasa de sexo M/F de 1,32. El ratio M/F después de transferencia de embriones en estadio de división fue de 1,04 (756/729). Los resultados de los meta-análisis que utilizaban un modelo de efecto fijo demostraron un mayor ratio M/F después de transferencia de blastocito comparado con ET en estadio de

Tabla 1
Datos demográficos de los estudios incluidos en la revisión sistemática

Estudio	Diseño de estudio	Período de estudio	Centro	Nº de pacientes (ciclos)	Nº de infantes nacidos después de FIV-ET	Resultados medidos
Estudios actualmente incluidos en el meta-análisis sobre el ratio de sexo de infantes nacidos después de FIV-ET						
Kausche et al., 2001 (11)	Estudio retrospectivo	1995-1996	Único centro	383 pacientes	500	Ratio de sexo, peso al nacer
Wilson et al., 2002	Retrospectivo no aleatorio	1997-2000	único centro	NA	468	Clínico, tasa de embarazo en curso, tasa de implantación, tasas de recién nacidos vivos, ratio de sexo
Milki et al., 2003 (13)	Retrospectivo	1998-2001	Único centro	369 pacientes	459	Ratio de sexo
Luna et al., 2007 (14)	Retrospectivo	2002-2005	Único centro	937 pacientes	1284 (autólogo)	Ratio de sexo
Estudios actualmente incluidos en el meta-análisis sobre el ratio MZT de infantes nacidos después de FIV-ET						
Sheiner et al., 2001 (35)	Anticipado comparativo	Enero 1998- Dic. 1999	Único centro	NA	204 embarazos	Incidencia de MZT
da Costa et al., 2001 (36)	Retrospectivo	Enero 1996- Dic. 1999	Único centro	2919 ciclos (335+2584)	943 embarazos	Incidencia de MZT
Milki et al., 2003 (37)	Retrospectivo	Enero 1998- Feb 2002	Único centro	NA	554 embarazos	Incidencia de MZT evaluado por TVS
Frattarelli et al., 2003 (16)	RCT	Enero 1999- May 2000	Único centro	49 pacientes	28 embarazos	En general múltiples tasas de embarazo
Jain et al., 2004 (17)	Retrospectivo	1997-2000	Único centro	90 + 75 = 165	85 embarazos	Incidencia de MZT
Wright et al., 2004 (34)	Caso control control	1999-2000	Multicéntrico	108,336 ciclos	38,030 embarazos	Tasa de MZT
Levitas et al., 2004 (38)	RCT	NA (to 2002)	Único centro	24 pacientes	9 embarazos	Tasa de formación BL, ET cancelación, embarazos, implantación, múltiples embarazos, y nacidos vivos
Papanikolaou et al., 2006 (18)	RCT	Jul 2003- Nov 2004	Único centro	351 pacientes	132 embarazos	Tasas de embarazos y partos
Moayeri et al., 2007 (39)	Retrospectivo	Mar 2002-	Único centro	NA	932 embarazos	Incidencia de MZT

Nota: BL = blastocito; ET = transferencia de embriones; MZT = gemelos monozigóticos; NA = no disponible; RCT = ensayo controlado randomizado; TVS = ecografía transvaginal.

división (OR 1.29, 95% CI 1,10-1,51), y esta diferencia fue estadísticamente significativa. No se detectó heterogeneidad ($I^2 = 0\%$; Fig. 1).

En el presente meta-análisis, se consiguió una significancia estadística en el análisis del ratio M/F de blastocito versus ET en estadio de división con datos combinados de cuatro estudios retrospectivos que fueron relativamente de larga escala. Cuando analizamos el ratio M/F después de añadir datos de cuatro estu-

dios no publicados (20-23), la transferencia de blastocito resultó en un ratio M/F de 1,36 (1,071/790), el cual fue significativamente diferente de 1,05 (1,279/1,220) para el ET en estadio de división. El OR utilizando un modelo de efecto fijo fue de 1,29 (95% CI 1,13- 1,47; $I^2 = 0\%$), el cual es al menos igual al OR incluido para los estudios publicados.

El riesgo de MZT fue mayor después la transferencia de blastocito que de ET en estadio de división, pero

Tabla 2

Resultados de la hiperestimulación ovárica controlada y FIV-ET entre los dos grupos

Estudio	Protocolo de estimulación ovárica	Señal de maduración oocitaria final	Fertilización	Tipo de ET	Medio de cultivo	Nº de ET (BL/CL)	Definición de MZT
Estudios actualmente incluidos en el meta-análisis sobre el ratio de sexo de infantes nacidos después de FIV-ET							
Kausche et al., 2001 (11)	hMG/FSH con protocolo largo o corto con GnRH	NA	Natural/ICSI	BL (D5-7)/EC (D2-3)	Medio Secuencial (+albumina/ factor decrecimiento)	1-4 embriones (media 2,4)	
Wilson et al., 2002 (12)	Altamente purificada/ FSH recombinante con protocolo largo con GnRH	hCG	Natural/ICSI	BL(D5)/EC (D3)	Fluido tubárico humano + plasma materno+medio secuencial	BL 2.0/EC 2,6	
Milki et al., 2003 (13)	NA	NA	Natural/ICSI	BL (D59)/EC (D3)	NA	NA	
Luna et al., 2007 (14)	NA	NA	Natural/ICSI	BL(D5)/EC (D3)	NA	NA	
Estudios actualmente incluidos en el meta-análisis sobre el ratio de sexo de infantes nacidos después de FIV-ET							
Sheiner et al., 2001 (35)	NA	Natural/ICSI	BL(D5)/EC (D3)	Medio libre de células	NA	NA	
da Costa et al., 2001 (36)	hMG/FSH con r-FSH	hCG	Natural/ICSI	BL(D5)/EC (D3)	Medio secuencial	2,54/3,9	TVS ^a
Milki et al., 2003 (37)	agonistas de la GnRH + OCs	hCG	Natural/ICSI	BL(D5)/EC (D3)	Medio para blastocito (Irvine) + 10% sustituto de suero sintético (SSS)	NA	TVS ^a
Frattarelli et al., 2003 (16)	NA	NA	Natural/ICSI	BL(D5-6)/EC (D3)	NA	2,0 ± 0,2/3,0 ± 0,5	TVS ^b
Jain et al., 2004 (17)	hMG/FSH con agonistas de la GnRH	hCG	Natural	BL(D5-6)/EC (D3)	Medio para blastocito (Irvine) + 10%	2,0 ± 2/3,0 ± 2	TVS ^a
Wright et al., 2004 (34)	NA	NA	Natural/ICSI	BL(D5)/EC (D3)	NA	SSS NA	TVS ^b
Levitas et al., 2004 (38)	GnRH largo, protocolo corto + hMG	hCG	Natural/ICSI	BL(D5-7)/EC (D2-3)	Medio secuencial	1,9 ± 0,4/3,4 ± 0,7	TVS ^b
Papanikolaou et al., 2006 (18)	rFSH + GnRH antagonista de	hCG	Natural/ICSI	BL(D5)/EC (D3)	Medio secuencial	1/1	TVS ^b
Moayeri et al., 2007 (39)	hMG/FSH con agonistas de GnRH (largo o microdosis flare) o antagonistas	u-hCG o rhCG	Natural/ICSI/AH	BL(D5)/EC (D3)	Medio para blastocito o medio para blastocito Quinn's Advantage	NA	TVS ^a

Nota: AH = hatching asistido; D = día; EC = división temprana; ICSI = Inyección intracitoplasmática de esperma; otras abreviaturas como en Tabla 1.

^aDe finido como más de un feto con actividad cardíaca observado en el mismo saco gestacional.

^bDe finido como embarazos en los cuales el número de latidos fetales observados en ecografía sobrepasan el número de embriones transferidos. Chang. *Impact of blastocyst transfer. Fertil Steril* 2009.

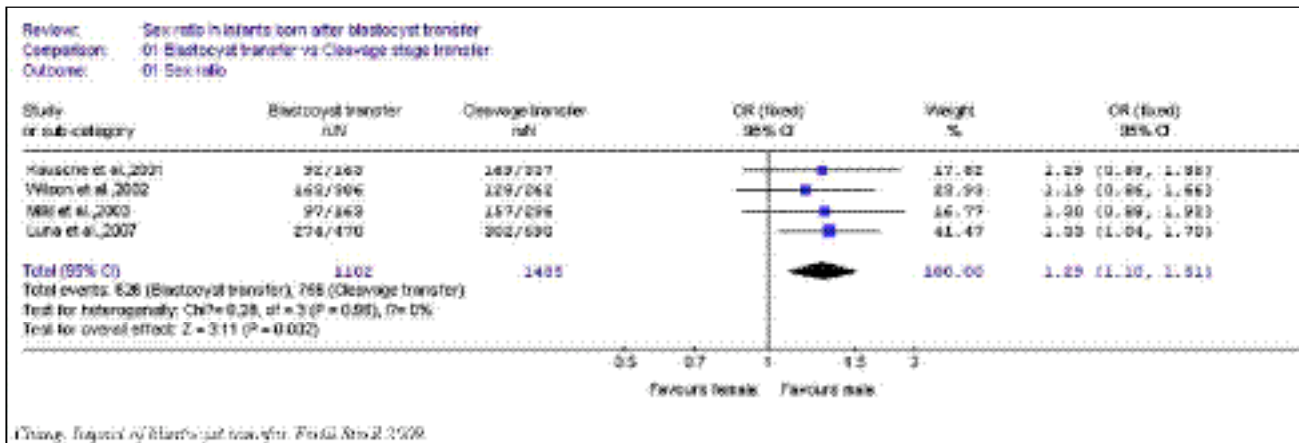


Figura 1

Ratio de sexo en infantes nacidos después de transferencia de embrión en estadio de división o blastocito. CI=intervalo de confianza; OR=odds ratio

solo se consiguió una significancia estadística en cuatro de los reportes. Los resultados de los meta-análisis utilizando un modelo de efecto random también demostraron un mayor riesgo de MZT después de transferencia de blastocito que después de ET en estadio de división (OR 3,04, 95% CI 1,54-6,01; I² = 57,9%), y esta diferencia fue estadísticamente significativa (Fig. 2).

Hubo una diferencia substancial entre los estudios acerca de MZT. Realizamos un meta-análisis de efecto random para incorporar la heterogeneidad entre los ensayos de MZT. Se establecieron subgrupos basados en el período de estudio. Debido a que el medio de cultivo

secuencial es una importante parte de la técnica de cultivo de blastocitos, comparamos un subgrupo antes y después de 2002, cuando fue incorporado en el uso clínico. La Figura 3 muestra que hubo una diferencia significativa en las tasas de MZT durante el período anterior a 2002 (OR 4,05, 95% CI 3,16-5,18). Sin embargo, no hubo diferencia en las tasas de MZT en los estudios después de 2002 (OR 1,00, 95% CI 0,43-2,32; Fig. 3).

DISCUSIÓN

Hemos encontrado un desequilibrio en la tasa de se-

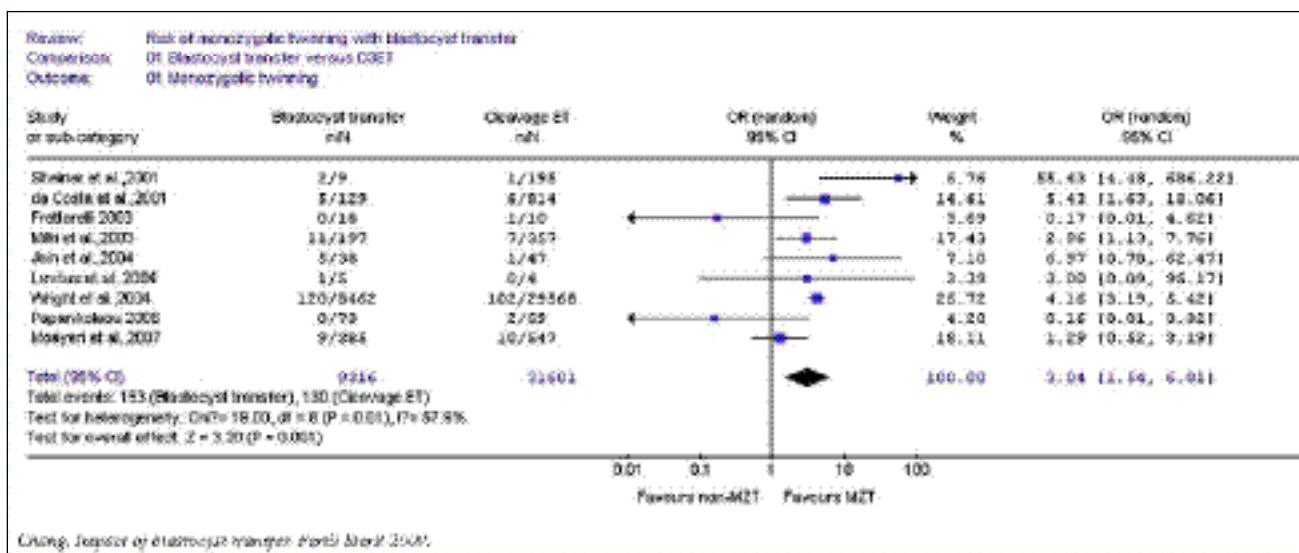


Figura 2

Tasas de gemelos monocigotos por embarazo utilizando un modelo de efecto random. Abreviaturas como en Figura 1

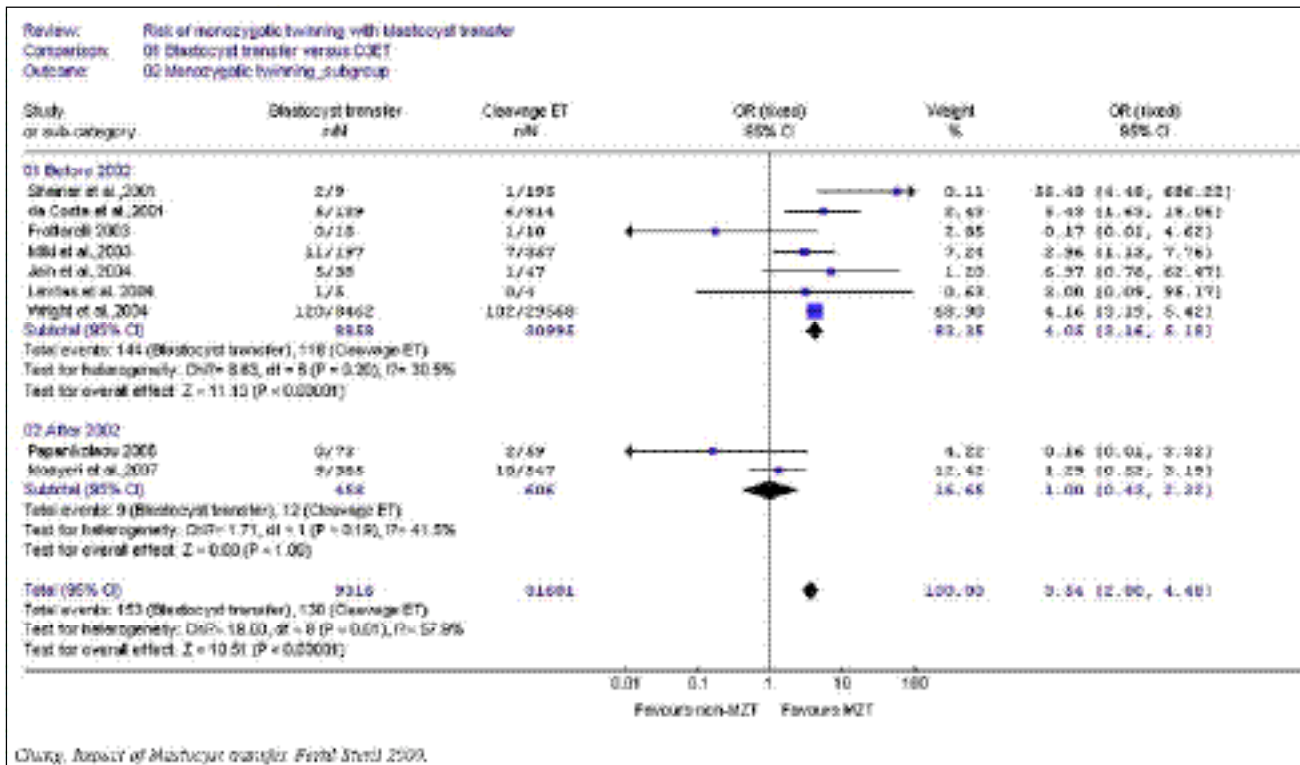


Figura 3

Tasas de gemelos monocigotos por embarazo (agrupados por período de realización de los estudios) utilizando un modelo de efecto fijo. Abreviaturas como en Figura 1

xo para embarazos que resultaron de transferencia de blastocito, con una mayor frecuencia de varones; 56,8% de los infantes fueron hombres después de transferir blastocito. En contraste, 50,9% fueron mujeres después de ET en estadio de división. Estudios anteriores individuales no muestran una tasa de sexo significativamente alterada después de transferencia de blastocito debido principalmente a sus faltas de poder estadístico. Milki y col (13) reportaron que la significancia estadística estaba presente solo después de juntar los datos de estudios de población publicados y no publicados. Ellos reportaron un ratio mujer/varón de 1:1.34 (594/797 o 42,7%/57,3%) para transferencia de blastocito comparado con 1:1,04 (932/977 o 48,8%/51,2%) para transferencia de embriones en día 3 (P=0.0001).

Se ha reportado previamente en estudios en bovinos y murinos que embriones en división masculinos dividen más rápidamente que embriones femeninos. En humanos los recién nacidos varones fueron seis veces superiores cuando el número medio de células fue más que cuatro en el día 2 de ET (40). En forma similar, Ray y col. mostraron que los embriones varo-

nes cultivados para estadio de blastocito tuvieron un número mayor de células en día 2 que en embriones femeninos y que esta diferencia fue mantenida hasta el estadio de blastocito en ambos trofoectodermos y masas de células internas (ICM) (41). Debido a que frecuentemente se eligen los blastocitos con desarrollo más veloz y más expandidos, es posible que el ratio de sexo pueda estar alterado a favor de varones en los ciclos de transferencia de blastocito. Kausche y col. (11) describieron una inclinación más pequeña en el ratio de sexo a varones, a diferencia de otros estudios, quizás debido a que se realizaron transferencias en día 6 de cultivo embrionario, permitiendo a los blastocitos de desarrollo más lento a expandirse más completamente y alcanzar un estadio de desarrollo similar comparado con los blastocitos de desarrollo más veloz en día 5.

Los gemelos monocigotos ocurren cuando el cigoto se parte en estadios variables de desarrollo después de fertilización de un único ovocito por un único espermatozoide (42). El tratamiento de FIV/ICSI aumenta la incidencia de MZT tres a veinte veces; esto ha sido reportado de ser el 0,42% en la población ge-

neral (43), y 1,2%-8,9% en la población de FIV (25, 44, 45). De acuerdo a los resultados de el presente meta-análisis, la incidencia de MZT fue de 1,64% después de transferir blastocito y 0,41% después de ET en estadio de división. Los embarazos con MZT fueron considerados de riesgo, debido a los abortos, anomalías congénitas estructurales (como gemelos siameses, gemelos a cardíacos, y reducciones límbicas), exceso de bajo peso al nacer, discordancia de crecimiento, parto predeterminado, y morbilidad neurológica es más común en gemelos di cigotos (46-47). En estudios animales, se ha sugerido un posible incremento de disfunciones epigenéticas con MZT. Esto puede ser debido a aumentar las posibilidades de desordenes de huellas genéticas (48).

Aunque el mecanismo que lleva a MZT no es completamente entendido, muchos investigadores han propuesto varias explicaciones. La división de la ICM en un estadio temprano de desarrollo puede causar duplicación de embriones (44-45), posiblemente sea un evento frecuente en embarazos múltiples (37, 49).

En condiciones de cultivo in vitro, MZT puede ser el resultado de un evento de hatching anormal, inducido por una rotura de la integridad de la zona pelúcida (ZP), herniación de las blastómeras, y división del embrión. Esta rotura en la ZP puede ser causada por procedimientos de TRA como ICSI y/o assisted hatching (AH). El daño de la ZP puede estimular la división e la ICM y por ello la producción de dos embriones monocigotos. La transferencia del embrión en estadio retrasado puede por ello incrementar la incidencia del daño de la ZP debido a la exposición continua y manipulación de la ZP en condiciones de cultivo in vitro. Sumado a esto las condiciones de cultivo in vitro pueden endurecer la ZP, haciendo más susceptible al embrión a MZT (36).

Sin embargo, Schachter y col. (50) reportó que las tasas de MZT fueron consistentemente incrementadas después de FIV, independiente de la modalidad de tratamiento o micro manipulación. Ellos observaron que la incidencia de MZT después de FIV convencional fue 0,72% (1/139). Después de FIV-ICSI/AH, MZT sucedió MZT en 0,86% (4/463), este fue incrementado más del doble comparado con la tasa acumulada de la población general (0,42%) (43). Otros no reportaron diferencias en la incidencia de MZT en ICSI y ciclos de AH comparados con FIV sin rotura de zona (44, 50). Estos resultados inconsistentes de estudios previos sugieren que un mecanismo desconocido, o que la micro manipulación están envueltos en la división de los embriones.

Una teoría alternativa es que puede ocurrir un desarrollo discordante entre células adyacentes y resul-

tar en una repulsión y división temprana del embrión. Una pequeña proporción de ovocitos pueden tener una tendencia innata de sufrir una división del cigoto en fertilización. Esta puede llevar a la constante prevalencia de MZT espontáneo entre diferentes poblaciones. La estimulación ovárica puede entonces aumentar predictivamente el número de ovocitos disponibles propensos a división y en consecuencia puede incrementar las posibilidades de estos ovocitos de desarrollarse en MZT (51).

Otros mecanismos sugeridos para el aumento de las tasas de MZT después de transferir blastocito son la extensión del tiempo de cultivo, composición del medio de cultivo, y la experiencia de los laboratorios de embriología (39). Alternativamente, en transferencia de blastocito con cocultivo no hubo casos de MZT en más de 800 nacimientos (52). Es posible que el contenido más elevado de glucosa en medios de cultivo secuencial que en el método de cocultivo produce más radicales libres los cuales pueden inducir a apoptosis llevando a la rotura de ICM y supuestamente dividiéndose en gemelos idénticos.

Jain y col. (17) sugirió una posible curva de aprendizaje para cultivo de blastocitos y método de transferencia. Aunque los números fueron pequeños, 38 embarazos de 75 transferencias de blastocitos resultaron en cinco embarazos MZT. Tres de los cinco embarazos ocurrieron en los primeros siete embarazos. Un resultado similar fue reportado por Moayeri y col. (39); su más reciente experiencia (2,3%) sugiere que el riesgo de MZT con blastocito ET declina significativamente comparado con su experiencia anterior (5,6%). Ellos explican que el cambio de riesgo puede deberse a varios cambios en el sistema de cultivo, intercambio de medios de cultivos, y una mayor experiencia de los embriólogos. No hay un método definido de disminuir la incidencia de MZT durante FIV. Sin embargo, puede ser de ayuda para disminuir las incidencias de MZT optimizando las condiciones de cultivo, desarrollo de sistemas de medios de cultivo y embriólogos bien entrenados. A medida que los embriólogos desarrollan más experiencia con el cultivo de blastocitos, puede incrementar su habilidad para seleccionar blastocitos óptimos para transferir.

Basados en el presente meta-análisis, se encontró un mayor ratio de M/F después de transferir blastocito en fresco. El riesgo de MZT fue significativamente mayor en la transferencia de blastocito comparado con ET en estadio de división. Sin embargo la interpretación de estos datos debe ser tomado con cautela. Primero, los resultados están basados en un pequeño número de estudios retrospectivos (cuatro para ratio de sexo y seis para tasas de MZT). Aunque tres de los

estudios incluidos fueron diseños prospectivos randomizados para las tasas de MZT, una pequeña muestra puede sobreestimar el efecto de tratamiento en el evento (riesgo de MZT). Generalmente, el poder estadístico de un ensayo está determinado por el tamaño de su muestra y el número de participantes que experimentan el evento de interés. Una menor calidad de los ensayos o una muestra más pequeña tiende a mostrar mayores efectos de tratamiento. Segundo, el criterio diagnóstico para MZT varió en los estudios incluidos, y por ello la estimación de la tasas de MZT puede no ser precisa. El criterio utilizado más frecuentemente para MZT en una población de infantes después de FIV, fue contar el número de gemelos monocoriónicos, ambos por ecografía prenatal o por examen de placenta postparto. Sin embargo, evaluar MZT basado en estimaciones clínicas puede perder tanto como un tercio de los MZT comparado con exámenes genéticos más precisos como por ejemplo huella digital de DNA utilizando sangre de cordón, saliva o frotis bucal. Además hay un problema de detección de sesgos porque el cálculo clínico es improbable de ser tan riguroso entre los embarazos múltiples conseguidos espontáneamente (53). No hubo ningún estudio donde se utilizara el examen de DNA postparto para establecer la discigosidad o examen de las membranas y de la placenta. En los estudios incluidos en el meta-análisis presente, un investigador no describió cómo realizó el diagnóstico, y la mayoría de los estudios definieron MZT basados en descubrimientos por ecografía transvaginal, ej. más de un feto con actividad cardíaca visto en el mismo saco gestacional o que el número de embriones transferidos fue superado por de número de sacos. Tercero, debido a que se incluyeron estudios observacionales en el presente análisis, puede haber factores de confusión como temas heterogéneos de estudio, diversos protocolos de investigación, y diferentes medios de cultivo. Estos factores de confusión pueden influir en las medidas de los resultados. Sumado a la obvia heterogeneidad clínica en los estudios incluidos, la heterogeneidad estadística se notó también en lo que respecta al riesgo de MZT. Aunque utilizamos un modelo de efecto random, la exploración de la heterogeneidad en la revisión presente (especialmente el riesgo de MZT después de transferencia de blastocito) no fue posible por el número limitado de estudios disponibles. A pesar de la heterogeneidad estadística, los resultados de los análisis demostraron una mayor tasa de MZT con transferencia de blastocito.

En conclusión, el meta-análisis demostró que la transferencia de blastocito parece estar asociada significativamente con una mayor frecuencia de varones

y tasas aumentadas de MZT comparado con ET en estadio de división. Los riesgos asociados con la transferencia de blastocito deberían ser tenidos en cuenta a la hora de aconsejar las pacientes infértiles.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M.:** Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;CD002118.
2. **Jones GM, Trounson AO.:** Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. The benefits of extended culture. *Hum Reprod* 1999; 14: 1405-8.
3. **Marek D, Langley M, Gardner DK, Confer N, Doody KM, Doody KJ.:** Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1999; 72: 1035-40.
4. **Tsirigotis M.:** Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. Too soon to abandon current practice? *Hum Reprod* 1998; 13: 3285-9.
5. **Menez YJ, Chouteau J, Torello J, Girard A, Veiga A.:** Birth weight and sex ratio after transfer at the blastocyst stage in humans. *Fertil Steril* 1999; 72: 221-4.
6. **Dumoulin JC, Derhaag JG, Bras M, Van Montfoort AP, Kester AD, Evers JL, et al.:** Growth rate of human preimplantation embryos is sex dependent after ICSI but not after IVF. *Hum Reprod* 2005; 20: 484-91.
7. **Avery B, Madison V, Greve T.:** Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. *Theriogenology* 1991; 35: 953-63.
8. **Valdivia RP, Kunieda T, Azuma S, Toyoda Y.:** PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured in vitro. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 121-6.
9. **Boklage CE.:** The epigenetic environment: secondary sex ratio depends on differential survival in embryogenesis. *Hum Reprod* 2005; 20: 583-7.
10. **Tarin JJ, Bernabeu R, Baviera A, Bonada M, Cano A.:** Sex selection may be inadvertently performed in in-vitro fertilization-embryo transfer programs. *Hum Reprod* 1995; 10: 2992-8.
11. **Kausche A, Jones GM, Trounson AO, Figueiredo F, MacLachlan V, Lolatgis N.:** Sex ratio and birth weights of infants born as a result of blastocyst transfers compared with early cleavage stage embryo transfers. *Fertil Steril* 2001; 76: 688-93.
12. **Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R.:** Integration of blastocyst transfer for all patients. *Fertil Steril* 2002; 77: 693-6.
13. **Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Westphal LW, Giudice LC, Behr B.:** Comparison of the sex ratio with blastocyst transfer and cleavage stage transfer. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:323-6.

14. **Luna M, Duke M, Copperman A, Grunfeld L, Sandler B, Barritt J.:** Blastocyst embryo transfer is associated with a sex-ratio imbalance in favor of male offspring. *Fertil Steril* 2007; 87: 519-23.
15. **Rijnders PM, van Os HC, Jansen CAM.:** Increased incidence of monozygotic twinning following the transfer of blastocysts in human IVF/ICSI. *Fertil Steril* 1998; 70: S15-6.
16. **Frattarelli JL, Leondires MP, McKeeby JL, Miller BT, Segars JH.:** Blastocyst transfer decreases multiple pregnancy rates in in vitro fertilization cycles: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2003; 79: 228-30.
17. **Jain JK, Boostanfar R, Slater CC, Francis MM, Paulson RJ.:** Monozygotic twins and triplets in association with blastocyst transfer. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 103-7.
18. **Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P.:** In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N Engl J Med* 2006; 354: 1139-46.
19. **Edwards RG, Brody SA.:** History and ethics of assisted human conception. In: *Principles and practice of assisted human reproduction*. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 17-47.
20. **Meintjes M, Crider-Pirkle S, Ward D, Rodríguez J, Chantilis S, Madden J.:** Sex ratio and birthweight outcome when considering blastocyst expansion, multiple gestation, and facility. *Fertil Steril* 2001; 76: S147.
21. **Rodríguez H, Bustillo M, La Palme J, Riley E, Eiseremann J, Thompson K.:** Clinical outcomes with transfer of blastocyst or cleavage stage embryos: high order pregnancies, newborn weights, and sex ratio. *Fertil Steril* 2001; 76: S170.
22. **Anderson M, Graham J, Tucker M, Krecko T, Levy M, Widra E.:** Comparison of gender and birth weight following day three and blastocyst transfers. *Fertil Steril* 2001; 76: S179.
23. **Mercader A, Gamiz P, de los Santos M, Remohii J, Pellicer A, Simon C.:** Sex ratio after day 2, day 3, or blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2001; 76: S261-2.
24. **Quintans CJ, Donaldson MJ, Blanco LA, Sergio Pasqualini R.:** Deviation in sex ratio after selective transfer of the most developed cocultured blastocysts. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 403-4.
25. **Alikani M, Noyes N, Cohen J, Rosenwaks Z.:** Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture. *Hum Reprod* 1994; 9: 1318-21.
26. **Peramo B, Ricciarelli E, Cuadros-Fernandez JM, Huguet E, Hernandez ER.:** Blastocyst transfer and monozygotic twinning. *Fertil Steril* 1999; 72: 1116-7.
27. **Behr B, Fisch JD, Racowsky C, Miller K, Pool TB, Milki AA.:** Blastocyst-ET and monozygotic twinning. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 349-51.
28. **Chow JS, Benson CB, Racowsky C, Doubilet PM, Ginsburg E.:** Frequency of a monochorionic pair in multiple gestations: relationship to mode of conception. *J Ultrasound Med* 2001; 20: 757-60.
29. **Tarlatzis BC, Qublan HS, Sanopoulou T, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J.:** Increase in the monozygotic twinning rate after intra cytoplasmic sperm injection and blastocyst stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2002; 77: 196-8.
30. **Alikani M, Cekleniak NA, Walters E, Cohen J.:** Monozygotic twinning following assisted conception: an analysis of 81 consecutive cases. *Hum Reprod* 2003; 18: 1937-43.
31. **Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, Lahloub TM, Ibrahim MH.:** Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2002; 77: 114-8.
32. **Emiliani S, Delbaere A, Vannin AS, Biramane J, Verdoodt M, Englert Y, et al.:** Similar delivery rates in a selected group of patients, for day 2 and day 5 embryos both cultured in sequential medium: a randomized study. *Hum Reprod* 2003; 18: 2145-50.
33. **Kolibianakis EM, Zikopoulos K, Verpoest W, Camus M, Joris H, Van Steirteghem AC, et al.:** Should we advise patients undergoing IVF to start a cycle leading to a day 3 or a day 5 transfer? *Hum Reprod* 2004; 19: 2550-4.
34. **Wright V, Schieve LA, Vahratian A, Reynolds MA.:** Monozygotic twinning associated with day 5 embryo transfer in pregnancies conceived after IVF. *Hum Reprod* 2004; 19: 1831-6.
35. **Sheiner E, Har-Vardi I, Potashnik G.:** The potential association between blastocyst transfer and monozygotic twinning. *Fertil Steril* 2001; 75: 217-8.
36. **da Costa AA, Abdelmassih S, de Oliveira FG, Abdelmassih V, Abdelmassih R, Nagy ZP, et al.:** Monozygotic twins and transfer at the blastocyst stage after ICSI. *Hum Reprod* 2001; 16: 333-6.
37. **Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Behr B, Giudice LC, Westphal LM.:** Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertil Steril* 2003; 79: 503-6.
38. **Levitas E, Lunenfeld E, Har-Vardi I, Albotiano S, Sonin Y, Hackmon-Ram R, et al.:** Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Fertil Steril* 2004; 81: 567-71.
39. **Moayeri SE, Behr B, Lathi RB, Westphal LM, Milki AA.:** Risk of monozygotic twinning with blastocyst transfer decreases over time: an 8-year experience. *Fertil Steril* 2007; 87: 1028-32.
40. **Pergament E, Fiddler M, Cho N, Johnson D, Holmgren**

- WJ.:** Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Hum Reprod* 1994; 9: 1730-2.
41. **Ray PF, Conaghan J, Winston RM, Handyside AH.:** Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 1995; 104: 165-71.
 42. **Campbell IL, Stalder AK, Akwa Y, Pagenstecher A, Asensio VC.:** Transgenic models to study the actions of cytokines in the central nervous system. *Neuroimmunomodulation* 1998; 5: 126-35.
 43. **Bulmer MG. :** The biology of twinning in man. Oxford: Clarendon Press, 1970.
 44. **Sills ES, Moomjy M, Zaninovic N, Veeck LL, McGee M, Palermo GD, et al.:** Human zona manipulation and monozygotic twinning frequency after IVF. *Hum Reprod* 2000; 15: 890-5.
 45. **Abusheikha N, Salha O, Sharma V, Brinsden P.:** Monozygotic twinning and IVF/ICSI treatment: a report of 11 cases and review of literature. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 396-403.
 46. **Lynch A, McDuffie R, Stephens J, Murphy J, Faber K, Orleans M.:** The contribution of assisted conception, chorionicity and other risk factors to very low birth weight in a twin cohort. *BJOG* 2003; 110: 405-10.
 47. **Machin GA.:** Why is it important to diagnose chorionicity and how do we do it? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18: 515-30.
 48. **Hall JG.:** Twinning *Lancet* 2003; 362: 735-43.
 49. **Derom C, Vlietinck R, Derom R, Van den Berghe H, Thiery M.:** Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction. *Lancet* 1987; 1: 1236-8.
 50. **Schachter M, Raziel A, Friedler S, Strassburger D, Bern O, Ron-El R.:** Monozygotic twinning after assisted reproductive techniques: a phenomenon independent of micromanipulation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1264-9.
 51. **Blickstein I, Keith LG.:** On the possible cause of monozygotic twinning: lessons from the 9-banded armadillo and from assisted reproduction. *Twin Res Hum Genet* 2007; 10: 394-9.
 52. **Menezo YJ, Sakkas D.:** Monozygotic twinning: is it related to apoptosis in the embryo? *Hum Reprod* 2002; 17: 247-8.
 53. **Blickstein I.:** Estimation of iatrogenic monozygotic twinning rate following assisted reproduction: pitfalls and caveats. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 365-8.