

## Transferencia embrionaria: simplificando la complejidad

### Embryo transfer: simplifying complexity

Vicente López Villaverde, Lorena Montero Venegas

Embryocenter CIVTE. Centro de inseminación y transferencia embrionaria. Sevilla

#### RESUMEN

La Transferencia Embrionaria (TE) es el último paso en cualquier tratamiento de FIV/ICSI y puede que uno de los puntos más importantes. Su éxito depende, no sólo del potencial biológico de los embriones y de la receptividad endometrial, sino también de que la intervención sea técnicamente correcta.

Hasta hace algunos años la importancia de la TE recaía, sobre todo, en el número de embriones y en la calidad de los mismos, más que en la calidad metodológica de la propia transferencia. Sin embargo, los distintos aspectos de esta metodología han ido adquiriendo importancia propia por lo que hoy día se hace necesario que cada centro disponga de protocolos específicos de trabajo que eviten la variabilidad y permitan una actuación adecuada en cada caso.

Nuestro objetivo con este trabajo es el de profundizar en el estado actual de los conocimientos de la TE para que éstos permitan simplificar el proceso.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2013; 30; 3-22 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Palabras claves:** *Transferencia embrionaria, calidad embrionaria, transferencia de embrión único (SET)*

#### SUMMARY

Embryo Transfer (ET) is the last step of any ICSI/IVF treatment and possibly one of the most important. Its success depends, not only on the biological potential of the embryos and endometrial receptivity, but also on a technically correct intervention.

In the past, ET effectiveness was determined by the number and quality of the embryos you could obtain, more than the methodological quality of the transfer itself. Nonetheless, the different aspects of this methodology have acquired more attention and importance with time, which is why today it is paramount

Aceptado: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Autor para correspondencia: Dr. Vicente López Villaverde, Lorena Montero Venegas

Embryocenter CIVTE. Avenida de Cádiz 27/29, 41004. Sevilla

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: contacto@editorialmedica.com

---

for every centre to use specific work protocols to avoid variability and to allow an adequate procedure for each case. Our aim in this study was to review and analyze the current state of affairs of ET research to allow for a simplification of this process.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2013; 30; 3-22 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Key words:** *Embryo Transfer, embryo quality, single embryo transfer (SET)*

## INTRODUCCIÓN

La transferencia embrionaria (TE) es la intervención que permite el contacto entre el endometrio y el preembrión, haciendo posible la implantación de éste y el establecimiento de una gestación. Para ello, es necesario que el potencial biológico del preembrión sea adecuado (1), que el endometrio sea receptivo (2) y que la intervención sea técnicamente correcta, evitando el deterioro tanto del uno como del otro (3).

En la especie humana, la fecundación tiene lugar en el tercio externo de la trompa por lo que el cigoto debe ser transportado, a lo largo de aquélla, hasta la cavidad uterina. La formación del preembrión y, por ende, el desarrollo del blastocisto es el resultado de una serie de divisiones mitóticas que tienen lugar durante el transporte intratubárico. Este transporte es el efecto de la interacción entre el preembrión y el endosalpinx, un proceso en el que parecen jugar un papel los esteroides sexuales, las prostaglandinas y el factor activador de las plaquetas (PAF) (4).

Edwards y cols analizaron la cronología del desarrollo in vitro de preembriones humanos, evidenciando que el estadio de dos células se alcanza a las 28 horas, el de 4 a las 43 horas y el de 8 células a las 54 horas de la fecundación. Así mismo, comprobaron que la compactación se inicia en el estadio de 16 células y que la formación del blastocisto se inicia entre los días 4 y 5 post-fecundación (5).

Es importante señalar que, en la especie humana, el embrión de 4 a 8 células se encuentra, sistemáticamente, en la trompa y que sólo va a penetrar en el útero después de la compactación (6). Según esto, cuando la transferencia, como es habitual en la práctica, se hace en el día 2 ó 3 con respecto a la reproducción natural, el embrión llega a la cavidad endometrial con 3 ó 4 días de adelanto y ello podría tener como consecuencia una merma de las posibilidades de implantación debido a que: a) el genoma embrionario todavía no se ha activado y ello puede impedir la llegada de señales embrionarias al endometrio, b) no se han producido la diferenciación y la polarización celulares y c) la receptividad endometrial puede no ser la óptima.

De los numerosos factores implicados en el éxito de las técnicas de reproducción asistida (TRA) para tratar situaciones de esterilidad determinadas, como la obstrucción tubárica

bilateral, es preciso destacar los avances en la estimulación ovárica, para la obtención de múltiples preembriones (7) y del laboratorio en el cultivo embrionario (8), pero también el procedimiento de la TE, que ya en 1985 se relacionaba con el éxito en el tratamiento mediante FIV (9). No obstante, era concedida mayor importancia al número y calidad del embrión, o embriones transferidos, que a la calidad metodológica de la propia transferencia, sabiendo que la transferencia de múltiples preembriones, aunque importante para obtener una gestación, estaba relacionada con la gestación múltiple (10). Como afirmaron Schoolcraft y cols (3), tradicionalmente se ha concedido escasa importancia a la técnica de la TE que, en el momento de realizar una revisión en el año 2001, apenas se había modificado desde su descripción por Edwards y cols.

Sin embargo, con el tiempo, distintos aspectos de la transferencia fueron adquiriendo una relevante importancia hasta el punto que, actualmente, se hace necesario que un centro de reproducción disponga de un protocolo de trabajo en la TE que evite la variabilidad clínica y permita actuar de la forma más adecuada en cada caso.

En cada caso, el embriólogo responsable debe decidir el momento en que debe realizar la transferencia (preembrión en células o blastocisto), cuáles y cuántos son los embriones que debe transferir, el catéter que debe utilizar, etc. Por otra parte, debe obtener los datos necesarios para poder relacionar la calidad de la transferencia con los resultados clínicos, tasas de gestación e implantación, fundamentalmente. El protocolo de transferencia adoptado en un centro es importante porque va a marcar el ritmo de trabajo del equipo médico-biológico y va a acondicionar, como veremos, el equipamiento del centro.

## FACTORES QUE JUEGAN UN PAPEL EN LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La TE es un acto de la reproducción asistida en el que se pone de manifiesto la necesidad de colaboración entre clínicos y embriólogos. En efecto, sin embriones biológicamente competentes el tratamiento será un fracaso, pero los embriones competentes pueden ser irreversiblemente dañados durante una transferencia técnicamente incorrecta, lo que también llevaría al fracaso terapéutico.

---

Básicamente, parece posible clasificar los factores que pueden jugar un papel en la calidad de la TE en tres categorías distintas, aunque éstas pueden estar, en algún sentido, vinculadas; por ejemplo, el día post-punción en que la transferencia se realice y, por ende, el tipo de embrión y la receptividad endometrial están, sin lugar a dudas, relacionados. Las categorías de los factores que determinan la calidad de la transferencia son las relacionadas con el embrión, con el endometrio y con el procedimiento en sí.

### *a) Factores dependientes del embrión*

Entre ellos, los más importantes son su calidad, el número de embriones transferidos y el grado de su desarrollo.

#### **a.1. Calidad embrionaria**

Existen en el entorno dos clasificaciones de interés para ovocitos y embriones, la de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) (11) y la del Consenso de la Estambul (12)

##### *a.1.1. Clasificación de ovocitos*

La primera evaluación de calidad que hace el laboratorio tiene lugar sobre el estado de maduración de los ovocitos obtenidos en la punción folicular. Tras la recuperación y lavado de los mismos, se observa el grado de expansión del complejo corona-cúmulo-ovocito (CCO) porque que el aspecto morfológico de este complejo refleja el estado de maduración nuclear (13). El razonamiento de esta clasificación morfológica está basado en el que las células del complejo sufren distintos cambios durante el periodo ovulatorio que incluyen la dispersión, disminución de la densidad celular, y mucificación de la masa del cúmulo. Esta clasificación aporta información sobre la estimulación ovárica y constituye un factor pronóstico de los resultados de la fecundación, desarrollo e implantación; sin embargo su inconveniente es que el grado de expansión de las células del cúmulo no siempre se correlaciona con el estado de maduración (14, 15). Esta clasificación consta de tres grados: Grado 1(I): corresponde a ovocitos que presentan una corona expandida y laxa, en general, son ovocitos maduros en estado de MII. Grado 2 (II): corresponde a ovocitos con un cúmulo en estado intermedio entre compacto y laxo, puede tratarse de ovocitos en metafase I (MI). Grado 3(III): corresponde con ovocitos que presentan un cúmulo muy compactado, generalmente son ovocitos en estado de vesícula germinal (VG=PI).

En la mayoría de los ovocitos los signos de fecundación están visibles a las 17-20 h, por lo que se considera que un ovocito está fecundado normalmente, cuando, transcurrido este tiempo, se observa la presencia de 2 PN y 2 CP.

Los cigotos se clasifican en distintos grupos según los pre-

cursores nucleolares (lugares de transcripción activa de los genes que codifican para ARN r), el tamaño y posición relativa de los mismos.

##### *a.1.2. Clasificación de embriones en células*

Los embriones se observan en un microscopio invertido a 400 aumentos. Esta observación se hace para el día 2 a las 44+/- 1 horas y para el día 3 a las 68 +/- 1 horas.

Según los criterios de ASEBIR, se contemplan 4 categorías (A-D) divididas en función del potencial implantatorio esperado, siendo la A la que se corresponde con embriones de óptima calidad con máxima capacidad de implantación y la D con embriones de mala calidad con probabilidad de implantación baja (16).

Los parámetros evaluados por ASEBIR en el estadio de D+2 y D+3 son: a) número celular y ritmo de división, b) porcentaje y tipo de fragmentación celular y c) desigualdad en el tamaño de los blastómeros.

El consenso de Estambul, a este respecto, clasifica a los embriones en células en grado 1,2 y 3 que se corresponden con embriones buenos, favorables y pobres, respectivamente. Para esta catalogación se consideran el grado de fragmentación, tamaño celular y la presencia de multinucleación.

En día 4 de desarrollo el embrión lleva a cabo la compactación celular y en el día 5 comienza a formarse la cavidad denominada blastocele, produciéndose la diferenciación celular hacia el estado de blastocisto. La transferencia en estadio de blastocisto podría permitir una mejor selección embrionaria y evitaría la exposición prematura de los embriones al entorno uterino en día 2-3 (en donde encontraría unos nutrientes inadecuados para su correcto desarrollo (17) y un estado de contractibilidad uterina superior al que existiría si la transferencia se retrasa hasta el estadio de blastocisto) mejorando así la implantación (18).

El cultivo prologado para transferencia en estadio de blastocisto, siempre que no se contradiga la voluntad de la paciente/pareja, suele hacerse en los siguientes casos: a) pacientes con fallo de implantación para observar el desarrollo embrionario, b) pacientes que deben evitar las gestaciones múltiples (útero malformado o antecedentes de patología obstétrica) mediante la transferencia de sólo blastocisto, c) pacientes del programa de DGP ya la transferencia de los embriones normales, para los cromosomas analizados, se realiza en el 5º día de desarrollo, d) cuando se dispone de muchos embriones, para disminuir el número total de embriones a congelar vitrificando sólo aquellos que alcanzan el estadio de blastocisto, e) cuando tengamos más de cuatro embriones de 8 células en D+3 siendo alguno de calidad A o B en casos favorables, es decir, pacientes menores de 37 años cuando éste sea su primer o segundo ciclo.

### *a.1.3. Evaluación mediante sistema computarizado*

Las evaluaciones de viabilidad embrionaria se basan principalmente en las características morfológicas de los embriones que suelen tener un componente subjetivo por parte del biólogo. La evaluación mediante sistema computarizado podría eliminar estos sesgos. En algunos estudios computarizados el tamaño de las blastómeras se ha correlacionado con la fragmentación y multinucleación, y en otros se ha relacionado el tamaño nuclear con el estatus de normalidad cromosómica. El desarrollo de un score automatizado para la morfología embrionaria ha revelado que los embriones que implantan tienen menos diferencia entre sus blastómeras en estadio de 6 células, y que volúmenes excesivos o pequeños del embrión en el día 2 y 3 poseen mal pronóstico (19).

### **a.2. Grado de desarrollo embrionario**

Ya ha sido señalado que, en el proceso fisiológico, el preembrión alcanza la cavidad uterina cuando se han iniciado la compactación y la expresión del genoma embrionario. En consecuencia, al menos desde un punto de vista teórico, puede aceptarse que la capacidad embrionaria para implantar es mayor cuando el preembrión alcanza mayor grado de desarrollo. Ello siempre que las condiciones de su desarrollo in vitro sean las adecuadas y no supongan un deterioro de esta capacidad.

De hecho, al ser transferidos blastocistos humanos obtenidos por lavado de la cavidad uterina, se observó una tasa de implantación de 60% (20). En la práctica, el problema en los años 80 y 90 era que los medios de cultivo existentes no permitían el desarrollo de blastocistos con la calidad biológica necesaria.

Efectivamente, el desarrollo de los preembiones en el laboratorio ha presentado dificultades debido a que las necesidades metabólicas de los mismos van cambiando con el tiempo, de forma que los medios de cultivo tienen que adaptarse a estos cambios para mantener la adecuada viabilidad embrionaria, como demostraron las investigaciones de Gardner y cols (6), que permitieron obtener blastocistos con elevada capacidad de implantación.

A lo largo de los años han sido realizados estudios retrospectivos y prospectivos destinados a analizar la conveniencia de realizar la transferencia en uno u otro plazo postpunción, lo que supone un mayor o menor grado de desarrollo del embrión.

El análisis retrospectivo de 2.297 transferencias realizado por Huisman y cols (21) mostró que las tasas de gestación evolutiva transfiriendo en día 2, 3 ó 4 eran, respectivamente, 23,3%, 21,9%, y 26,4%, con tasas de gestación múltiple de 36,2%, 38,8%, y 32,6%. Estos autores señalaron que la tasa

de implantación de una serie de mórulas cavitando fue sorprendentemente alta (41%). En la misma publicación fueron señaladas las ventajas de transferir blastocistos: a) mejorar las tasas de gestación e implantación, b) disminuir la tasa de múltiples al transferir menor número de embriones, c) debido al elevado número de preembiones que no alcanzan el estadio de blastocisto, disminuir las necesidades de criopreservación de preembiones “sobrantes” y d) poder disponer de más tiempo para la práctica de estudios genéticos de blastómeras biopsiadas.

Cuatro años más tarde, Alves da Motta y cols. comunicaron su experiencia utilizando secuencialmente dos medios de cultivo, el segundo, específico para blastocistos, a partir de las 72 horas de cultivo (22). Practicaron ICSI a 328 ovocitos, de los cuales 81 alcanzaron el estadio de blastocisto, siendo transferidos 54 (1 a 3 blastocistos por transferencia). Fue obtenida una tasa de gestación de 50% (15/30) por punción y 55,6% (15/27) por transferencia. Se produjo el nacimiento de 16 fetos vivos. Concluyeron apoyando el desarrollo rutinario a blastocisto utilizando medios comerciales.

Gardner y cols (6) realizaron un estudio prospectivo en el que compararon los resultados obtenidos tras la transferencia de blastocistos (n=8) con los obtenidos tras la transferencia en día 3 (n=15). Observaron que, aunque las tasas de gestación no mostraron diferencias entre los grupos, la tasa de implantación de los blastocistos fue el doble de la de los preembiones en células.

No obstante, puede afirmarse que un elevado porcentaje de preembiones detiene su desarrollo in vitro y no alcanza el estadio de blastocisto, habiendo sido postulado que la probabilidad de que se pueda realizar la transferencia con al menos un blastocisto depende del número de ovocitos obtenidos en la punción, número que está vinculado a la edad de las pacientes (23).

Siendo evidente que los blastocistos muestran una gran capacidad de implantación, Milki y cols (24) llevaron a cabo un estudio para comparar los resultados de transferir dos o tres blastocistos. No observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las tasas de gestación; sin embargo, la tasa de múltiples observada tras las transferencias de 2 blastos (39%, todos gemelares) fue significativamente menor que la observada tras la transferencia de 3 (79%, 29% de triples). Estos mismos autores confirmaron mayores tasas de gestación e implantación tras la transferencia de blastocistos que tras la transferencia en día 3 (25).

Un interesante análisis retrospectivo fue desarrollado por Racowsky y cols, relacionando el desarrollo embrionario hasta 8 células en día 3 con los resultados de las transferencias realizadas en día 3 o en día 5. Este estudio llevó a los

---

autores a recomendar transferir en día 5 cuando en día 3 se dispone de más de 3 embriones de 8 células y transferir en día 3 en caso contrario (26). En el mismo sentido se pronunciaron Shapiro y cols (27).

Sin embargo, otros investigadores no han confirmado diferencias significativas al comparar los resultados de la transferencia de preembriones en células con la transferencia de blastocistos (28). Una revisión sistemática en 2012 llevada a cabo por la Cochrane permitió obtener las mismas conclusiones ya que aunque se observó una pequeña diferencia significativa en las tasas de nacidos vivos en favor de la transferencia en blastocisto (día 5 a 6), las tasas acumuladas de embarazo clínico en fase de preembriones ( día 2 a 3 ), derivada de los ciclos en fresco y descongelados, dio lugar a mayores tasas de embarazo clínico. Aparte de la baja tasa de embarazo acumulado con la transferencia de blastocistos, otras desventajas incluían un menor número de embriones excedentes por pareja disponibles para la congelación y una mayor probabilidad de que no hubieran embriones que sobrevivieran hasta la fase de transferencia (29).

El comportamiento del embrión tras su descongelación es otro aspecto de enorme relevancia. La criopreservación embrionaria se ha convertido en una estrategia terapéutica esencial en la TRA, que permite, no sólo diferir la transferencia cuando la situación clínica lo aconseja, sino también aumentar la tasa acumulativa de embarazo y minimizar el riesgo de gestación múltiple mediante la transferencia selectiva de un sólo embrión (SET). En la actualidad es posible esperar que tras la desvitrificación, más del 90% de los embriones de buena calidad muestren blastómeras intactas y que las tasas de supervivencia general sean similares en todas las etapas de desarrollo, siendo esta característica de calidad la variable más importante relacionada con el resultado gestacional (30).

#### **En resumen:**

- La capacidad de implantación de los embriones cultivados in vitro aumenta a medida que progresa su desarrollo.
- Al desarrollar cultivos embrionarios prolongados se produce espontáneamente la selección de los embriones de mayor calidad biológica.
- Pueden darse casos en que ninguno de los embriones alcance el estadio de blastocisto.
- Aunque no se puede afirmar que deba intentarse transferir blastocistos en todos los casos, cuando se dispone de cuatro o más embriones de ocho células, puede tomarse la decisión de prolongar el cultivo con el fin de transferir blastocistos.
- Todo centro de reproducción asistida debe contar con la

posibilidad de desarrollar blastocistos in vitro para que sea posible la práctica de PGD.

- Los cultivos embrionarios prolongados incrementan el trabajo del laboratorio y las necesidades de equipamiento.
- Tras la desvitrificación las tasas de supervivencia embrionarias en embriones de buena calidad son similares en todas las etapas de desarrollo, siendo esta característica de calidad la variable más importante en el resultado gestacional.

#### **a.3. Número de embriones a transferir**

El número de preembriones disponibles para la transferencia y el número de preembriones transferidos ha sido considerado uno de los factores pronósticos para la obtención de una gestación clínica, como afirmaron Sharma y cols (31). En su publicación, estos autores citaban la transferencia de cuatro preembriones como la cifra óptima. Algunas publicaciones han recomendado la transferencia de un mayor número de preembriones en determinadas circunstancias, como después de varios fracasos terapéuticos (32).

En consecuencia, la conducta clínica habitual de la práctica totalidad de los centros de reproducción asistida fue transferir numerosos preembriones, en general cuatro e incluso mayor número en determinados casos, con el fin de obtener las mejores tasas posibles de gestación.

Se llegó así a una situación complicada: la tasa de gestación aumenta con el aumento del número de preembriones transferidos pero, paralelamente, aumentan la tasa de gestaciones múltiples, gemelares y de mayor orden y las complicaciones derivadas de tales gestaciones, como se desprende del estudio de Beral y cols a propósito de 4.000 nacidos tras FIV o GIFT (33).

Fue afirmado que el 16% de todas las muertes neonatales son consecuencia de las gestaciones múltiples y que el riesgo de morir durante el primer año de vida es 7 veces mayor para un nacido de una gestación múltiple (34).

Como consecuencia de todo ello, en la segunda mitad de la década de los 90 del pasado siglo, cundió la alarma en la comunidad científica dedicada a la medicina reproductiva (35), al constatar que la incidencia de la gestación múltiple se había multiplicado por 5 con respecto a 1990 y que casi un 30% de las gestaciones derivadas de los tratamientos de reproducción asistida son gestaciones múltiples mientras que sólo lo son el 2% de la población general (36, 37). Se afirmó que los tratamientos de la esterilidad “han dado lugar a una incidencia clínica y socialmente inaceptable de los llamados embarazos yatrógenos de grandes múltiples” (38) y se llegó a considerar la gestación múltiple la complicación más grave y frecuente de la reproducción asistida.

Obviamente, esta reacción de la comunidad científica se produjo ante el relevante incremento de la morbilidad materna (diabetes gestacional, amenaza de parto pretérmino, hemorragias, rotura prematura de membranas, preeclampsia) y de la morbimortalidad perinatal (prematuridad, bajo peso, distress respiratorio), con el significativo incremento de los costes personales y sociales que todo ello conlleva (39, 40).

En esta situación, el problema que se planteaba era disminuir la tasa de múltiples, sobre todo de triples o de mayor orden, sin disminuir las tasas de gestación clínica y ello conociendo que la limitación del número de preembriones en la transferencia se acompaña de una disminución de la tasa de gestación. Limitar la transferencia a dos preembriones y presentar los resultados en términos de nacidos vivos únicos fue recomendado, entre otras medidas, por el grupo de trabajo de la ESHRE (41).

Debido a esta situación y a la resistencia de todos los protagonistas, pacientes y profesionales (42) a reducir el número de embriones a transferir, se puso a punto una técnica destinada a reducir el número de embriones implantados. Se denominó “reducción embrionaria selectiva” y consistía en la punción y aspiración del saco embrionario, asociada o no a la inyección de CIK en el embrión, y la comprobación del cese de sus latidos cardiacos (43); esta técnica fue considerada éticamente aceptable. Sin embargo, esta intervención no está exenta de posibles complicaciones (44, 45), además de plantear problemas psicológicos y conflictos éticos (46, 47). En todo caso, no podía ser vista como una técnica de rutina para seguir transfiriendo un elevado número de embriones pensando que se practicaría la embrioreducción en caso de múltiple (48). Finalmente, la reducción embrionaria selectiva cayó en desuso y, en la actualidad no se practica como consecuencia de una fecundación *in vitro*. Quizás, muy excepcionalmente se practique tras una estimulación ovárica para inseminación artificial (49).

Si bien la técnica de la reducción embrionaria ecoguiada ha dejado de ser practicada para corregir la iatrogenia derivada de la transferencia de múltiples embriones, puede estar indicada y ser de utilidad cuando se practica para el tratamiento de otras patologías, como las gestaciones heterotópicas (50).

Simultáneamente al aumento de la preocupación por el incremento de las gestaciones múltiples y sus consecuencias, algunas voces, probablemente más comprometidas, iniciaron una fuerte campaña de concienciación de los profesionales, destinada a disminuir el número de embriones en la transferencia. En este sentido, los trabajos de Coetsier y cols (51), Fujii y cols (52) y Templeton y Morris (53) en 1998 al demostrar que el pronóstico de transferir dos em-

briones era tan bueno como la transferencia de 3 o más, contribuyeron a que la FIV tomase un giro radical para disminuir el número de gestaciones múltiples. Un año más tarde Vilska (54) en 1999 sugería que la SET podía ser preferible a la transferencia de dos y que además prevendría el resultado de dobles y en 2000, Strandell y cols (43) concluyeron que transferir un solo embrión en casos seleccionados haría bajar la tasa de múltiples de 26% a 13%, sin gravar excesivamente la tasa de gestación global.

Es destacable en este sentido que mientras que la ESHRE en 2012 (56) estimaba el índice de múltiples en Europa tras TRA en el 20,8%, en Finlandia en 2009, con una política comprometida con la SET, este porcentaje sólo era del 8,8% (57).

La SET es pues la opción más importante para la prevención de embarazos gemelares, ya que reduce la incidencia de gemelos al 1% (58).

En la revisión de la Cochrane de 2009 (59) se concluye que no hubo diferencias en las tasas de gestación acumulada entre transferir 2 embriones en fresco o hacer SET y transferir en un ciclo posterior un sólo embrión congelado si no hubiera gestación. Tampoco hubo diferencias entre una doble transferencia en fresco (2ET) y dos ciclos en fresco con SET. Aunque la probabilidad de nacido vivo por ciclo de tratamiento en fresco era el doble en la 2ET (OR: 2,10), también lo era la tasa de múltiples y la transferencia de 3 ó 4 embriones no demostraba ninguna ventaja respecto de la de dos.

A estas mismas conclusiones llegaba un metanálisis publicado en 2010 por McLernon (58), al observar que, aunque el porcentaje de nacidos vivos era menor en la SET (27%) que en la 2ET (42%), si la SET se seguía de transferencia de otro embrión descongelado, el índice acumulativo de embarazo resultaba similar (38% vs. 42%) con un mínimo riesgo de gestación múltiple (1% vs. 32%).

La crítica negativa que se le ha hecho a la SET se basa precisamente en la disminución de la tasa de embarazo por ciclo, lo que obliga a realizar más ciclos de tratamiento. Esta podría ser una de las razones principales por las que la SET sólo represente el 21% de todos los ciclos de fecundación *in vitro* en Europa (60).

En un estudio teórico de costes sobre 6153 mujeres tratadas en Escocia, la 2ET respecto de la SET, producía un coste añadido por cada hijo vivo adicional que variaba de 27356£ en mujeres de <33 años, a 15539 £ en mujeres de >39 años. Se concluye en este estudio que la SET es una opción útil coste-eficacia para mujeres de ≤36 años (61).

En un reciente estudio prospectivo en 438 pacientes, la edad de la mujer inferior a 29 años, el porcentaje de ovocitos

---

maduros obtenidos en la punción superior al 58% y la transferencia de blastocistos expandidos (grado 4-5) fueron las variables que se relacionaron positivamente con el embarazo clínico (62).

¿ Existe, por consiguiente, una edad propicia para la SET?.

A favor de que no hay una edad límite, están los trabajos en los que el ratio entre hacer SET o 2ET, respecto al porcentaje de nacidos vivos, no parece alterarse por el aumento de la edad (58) y, como ocurre también para otras edades, entre las mujeres menos jóvenes también es posible seleccionar aquellas de mejor pronóstico (con buena respuesta ovárica a dosis moderadas de gonadotropinas y número adicional de embriones para congelar) (63) y evitar embarazos múltiples que incrementen el riesgo obstétrico.

Pero extender la SET a todas las edades no parece estar justificado para otros investigadores (65) debido a que la incidencia de múltiples desciende con la edad de la mujer (10,8% cuando se hace 2ET en mujeres de más de 40 años) (65). En las edades más avanzadas, la ventaja de reducir el número de múltiples con la SET y posteriormente transferir embriones descongelados no parece ser significativa (6,7% en SET y 8,3% en 2ET) (63).

Aunque la SET está ganando popularidad en todo el mundo, la práctica de transferir un número elevado de embriones aún sigue recomendándose en determinadas circunstancias por algunas sociedades. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology en 2013, sigue contemplando la posibilidad de transferir 3 ó 3 más embriones a partir de 38 años y hasta 5 embriones, o 3 blastocistos, para las mujeres de 41-42 años (66).

#### **En resumen:**

- Transferir varios embriones aumenta la tasa de gestación y también la tasa de múltiples.
- Transferir dos embriones suprime el riesgo de triples pero mantiene un 25 a 30% de dobles.
- Transferir un único embrión sistemáticamente disminuye excesivamente la tasa de gestación.
- Una conducta razonable puede ser transferir un embrión en casos favorables.
- Se requiere un buen programa de criopreservación porque la transferencia de congelados recupera las tasas de gestación cuando los embriones disponibles son transferidos de uno en uno.

#### **b) Factores dependientes del endometrio**

La importancia de la receptividad endometrial ha sido clásicamente señalada en reproducción asistida (2), aunque

siempre se ha señalado que existe un desfase endometrial en el momento de la transferencia o la implantación tras FIV respecto a la implantación natural (67).

Se ha afirmado que el endometrio representa una barrera ante la implantación, excepto bajo apropiadas y definidas condiciones hormonales (68) en cuya regulación participan numerosos procesos endocrinos y paracrin, en especial, los que constituyen la relación embrio-materna: la sincronía entre el cuerpo lúteo, el embrión y el endometrio es crítica para una implantación normal. La época en que el endometrio permite que el embrión anide ha sido denominada “ventana de implantación”. Analizando ciclos de donantes y receptoras, Navot y cols (69) sugirieron que dicha ventana se extendía entre los días 20 y 24; más recientemente, Wilcox y cols (70) afirmaron que se produce en torno al pico de progesterona, 7 a 10 días después de la ovulación.

El desarrollo del endometrio depende de la secreción de estradiol y progesterona. Los elevados niveles de la fase folicular estimulan el crecimiento de la capa funcional y la angiogénesis. La progesterona transforma el endometrio proliferativo en secretor, un tejido capaz de nutrir al embrión.

La acción de la progesterona durante la fase lútea parece ser necesaria para la implantación; sin embargo la acción del estradiol durante esta fase no parece necesaria para el normal desarrollo del endometrio secretor (71).

El desarrollo del endometrio a lo largo del ciclo se modifica paralelamente a su morfología y los cambios que se producen suponen cambios en la receptividad endometrial. Por esta razón, desde los años 1950 se han desarrollado métodos para fechar el endometrio y valorar así su capacidad funcional en función de su aspecto histológico (72). Posteriormente, los criterios basados en la histología endometrial han sido muy criticados por su variabilidad interobservador, variabilidad ciclo a ciclo y variabilidad entre pacientes, siendo rechazados como exploración rutinaria en esterilidad (73), así como otros parámetros más actuales, como la expresión de integrinas y la formación de pinópodos.

El periodo de receptividad endometrial se corresponde con la entrada del blastocisto en la cavidad uterina. Cuando el embrión sale de la zona pelúcida queda expuesta la capa externa del trofoblasto y esta superficie epitelial está implicada en las interacciones embrión-endometrio (74). En el ser humano, el embrión penetra en la cavidad uterina 72 a 96 horas después de la fecundación (75) y la salida del embrión de la zona pelúcida tiene lugar a las 110 – 120 horas de la ovulación (76).

Los cambios estructurales que se observan en el endometrio se asocian a cambios en la expresión génica y a cambios

moleculares que juegan un papel en la implantación del blastocisto, como se observa en la formación de pinópodos y la expresión de Leukemia Inhibitory Factor (LIF) y su receptor (LIFR), lo que sugiere que ambos, cambios estructurales y moleculares, juegan un papel importante en el inicio de la implantación (77). LIF es un factor proimplantatorio (78).

La Interleukina 1 beta puede jugar un papel importante en la interacción embrio-materna, regulando la expresión de GnRH y su receptor factores que median la invasión del trofoblasto, en las células del estroma (79). Independientemente, las interleukinas, factores proinflamatorios, deben ser bloqueadas para que se produzca la implantación (78). Ha sido demostrada una marcada relación entre el sistema inmune (IL) y el sistema endocrino (GnRH) en la implantación embrionaria (80).

La LH juega un papel favoreciendo la maduración y decidualización del endometrio independientemente de su acción sobre el ovario (81), como ha sido evidenciado por la expresión de sus receptores en el estroma endometrial (82). Ha sido demostrado que hCG induce a nivel endometrial la expresión de LIF, VEGF y MMP-9 (83).

La expresión de integrinas en el endometrio guarda una marcada relación con la receptividad del mismo (84).

La investigación dirige muchos esfuerzos para detectar un buen marcador de la receptividad endometrial que podría permitir mejorar los resultados en reproducción asistida y optimizar los recursos.

El fechado histológico del endometrio fue el primer intento de valoración de la receptividad endometrial pero ya no se utiliza y durante los últimos años han sido descritos nuevos marcadores, con el advenimiento de la microscopía electrónica, las técnicas moleculares e inmunológicas y los análisis de ADN mediante microarrays.

Durante la fase secretora se desarrollan en el epitelio luminal estructuras elevadas que podrían estar destinadas a ampliar esta superficie y facilitar la interacción embrión-endometrio; estas estructuras reciben el nombre de pinópodos. Inicialmente se pensó que su desarrollo se limitaba a la ventana de implantación pero se ha comprobado una gran variabilidad en su visualización (85). Los pinópodos se asocian a determinadas proteínas como  $\alpha\beta 3$  integrina.

Ha sido sugerido que el daño endometrial intencionado mediante biopsia endometrial o legrado antes de la transferencia de embriones podría mejorar las posibilidades de implantación y posterior desarrollo aumentando así la probabilidad de un nacido vivo. En una revisión de cinco ensayos clínicos que habían evaluado el efecto de la lesión endometrial en las TRA se concluye que la lesión endome-

trial realizada el mes antes de iniciar la inducción de la ovulación aumenta las posibilidades de lograr un embarazo y un nacido vivo. Contrariamente a esto, las lesiones del endometrio llevadas a cabo sólo unos pocos días antes de transferir el embrión al útero reducen estas posibilidades de embarazo (86).

### c) Factores dependientes del procedimiento

La TE es el último paso, y probablemente uno de los más importantes, en el tratamiento de la FIV/ICSI requiriendo el adecuado trabajo conjunto de clínicos y embriólogos. El objetivo de una transferencia exitosa es depositar aséptica y atraumáticamente los embriones en una localización de la cavidad uterina donde tengan las mayores probabilidades de implantar. Tanto si no se dispone de embriones con capacidad biológica para implantar, como si el proceso de la transferencia es inadecuado, se producirá el fracaso del tratamiento.

Además de la receptividad endometrial y la calidad embrionaria, en la TE pueden confluír variables que influyen sobre su eficiencia tales como la experiencia del clínico, transferencia ecoguiada, tipo de catéter, técnica de transferencia, presencia de moco o sangre en el catéter, contracciones uterinas o dificultad del procedimiento. Un estudio prospectivo de cohortes reveló que la experiencia del clínico en transferencias posee un valor significativamente estadístico para el éxito de la técnica (87).

Inicialmente la TE se efectuaba haciendo avanzar el catéter de transferencia con los embriones en su interior hasta que su punta contactaba con el fondo uterino; acto seguido se retiraba 5-10 mm y se expulsaban los embriones hacia la cavidad uterina. Esta "transferencia a ciegas" tenía los inconvenientes de la subjetividad (se basaba en la capacidad del clínico para "sentir" la adecuada colocación del catéter) y de que el operador ignoraba cuando el catéter había sido mal colocado, circunstancia ésta que ocurría en el 20% de las veces (88).

El contacto con el fondo favorecía el sangrado y el estímulo de contracciones uterinas (89), que podrían expulsar los embriones transferidos fuera de la cavidad uterina, originando fallos o gestaciones ectópicas. Por estas razones, cuando las técnicas de TE evolucionaron hacia técnicas atraumáticas (evitando el contacto con el fondo uterino) comenzaron a mejorar los resultados precedentes.

En la actualidad el "toque clínico" se refiere a las técnicas de TE efectuadas sin soporte de imagen durante la transferencia, pero en las que se evita el contacto con el fondo porque se dispone de información previa.

La TE ecoguiada reportada por primera vez a mediados de



---

la década de 1980 (88) surgió como un método de transferencia que pretendía facilitar la inserción atraumática del catéter y garantizar su ubicación correcta en la cavidad uterina.

### **c.1. Preparación de la paciente para la TE**

Históricamente, la posición del útero dictaba la posición de la paciente durante la transferencia. La posición genupectoral fue utilizada para un útero en anteversión y la posición dorsal para el útero en retroversión. En la actualidad, se usa la posición de litotomía dorsal con independencia de la posición del útero, ya que esto no parece afectar a las PR (90). Debido a que el procedimiento no es necesariamente estéril, se puede hacer en la clínica o en una sala de operaciones.

Aunque, en general la TE no necesita de analgesia, algunos centros recomiendan su uso habitual u ocasional de una benzodiazepina, como el diazepam.

La administración de antibióticos antes de la TE ha comprobado que reduce la contaminación microbiana del tracto genital, pero no altera las tasas de embarazo clínico (91).

Algunos medicamentos, tales como la progesterona (P), Beta-miméticos, anti-prostaglandinas, y óxido nítrico, han sido propuestos como una forma de reducir la contractilidad uterina, pero de ellos sólo la P ha demostrado tener algún efecto relajante sobre el útero (92) y no hay evidencias que apoyen el beneficio de tales medidas.

### **c.2. Limpieza de la vagina y cérvix**

El moco cervical puede ser una fuente de contaminación del embrión y de la cavidad uterina. Se han comunicado frecuencias de cultivo positivo en el 71% de las pacientes y 49% de cultivos positivos del extremo del catéter, con tasas de gestación de 29% en los casos con cultivo positivo y 57% en los casos con cultivo negativo (93). La presencia de moco o sangre en la punta del catéter se ha asociado con menor índice de embarazos y mayor incidencia de embriones retenidos y expulsados hacia el cérvix. El embrión podría adherirse al moco o sangre que rodea el catéter durante la transferencia y la transferencia de moco o sangre a la cavidad uterina podría interferir en la implantación.

En general, el procedimiento se inicia mediante la colocación de un espéculo vaginal. Parecen aconsejables una cuidadosa limpieza de la cúpula vaginal y del cuello y la aspiración del moco cervical con una jeringuilla (94). Aunque la limpieza del cuello del útero y de la vagina con una solución salina reduce, hasta cierto punto la contaminación bacteriana, no se recomiendan los antisépticos vaginales debido a la potencial toxicidad sobre los embriones durante la transferencia, ni tampoco el uso previo de antibióticos, debido a la falta de beneficios comprobados.

Un estudio randomizado sobre 530 transferencias para evaluar el efecto de eliminar el moco cervical demostró una diferencia significativa, no sólo en el porcentaje de embarazos clínicos cuando se limpió el moco cervical, respecto al grupo control, ( PR 39,2% vs 22,6% ), sino también en el porcentaje de implantación ( 20,5% vs 12,2% ) y de nacidos vivos ( 33,6% vs 17,4% ). El odds ratio de embarazo en el grupo intervenido fue 2,27 respecto al grupo control (95). Otros estudios no han encontrado relación en el efecto de la contaminación del catéter por sangre o moco, (96, 97), pero la evidencia más consistente sugiere que la presencia de sangre disminuye las tasas de implantación y embarazo en proporción directa a su cantidad (98). Por otra parte, la presencia de sangre en torno al catéter o en su interior también puede ser considerada una manifestación de técnica defectuosa y condicionar un detrimento del resultado. Puede poner de manifiesto que endocérvid o endometrio han resultado dañados y ser la causa de un daño al endometrio si contamina el medio de cultivo (99).

### **c.3. Catéter y su preparación**

El catéter ideal para la TE debería ser lo suficientemente suave para evitar el traumatismo en el endocérvid o endometrio y lo bastante maleable para adaptarse al contorno natural de la cavidad uterina. En la actualidad existe una gran variedad de catéteres comercialmente disponibles.

Varios estudios han comparado la eficacia de los diferentes tipos de catéteres de transferencia, pero su elección sigue siendo un tema controvertido. Los catéteres firmes, más rígidos facilitan la técnica, sobre todo en las transferencias difíciles, pero conllevan más sangrado, trauma, y la estimulación de contracciones uterinas. En general, los catéteres “suaves”, como el de Cook y Wallace se prefieren a los “rígidos” como el TDT, Frydman, Tomcat, Tefcat y Rocket, ya que tienen menos probabilidades de lacerar el cuello uterino y el endometrio (100-102).

En dos meta-análisis de ensayos clínicos, la utilización de catéteres blandos se asoció con una PR más alta que los catéteres rígidos (103, 104). No parece existir diferencias de eficacia entre los diferentes catéteres suaves (105, 106). De cualquier forma, si se hace necesario utilizar un catéter más rígido, se aconseja no sobrepasar el orificio cervical interno con la guía y pasar a su través un catéter suave (107).

El uso generalizado de la ecografía para la TE, está favoreciendo la aparición de catéteres ecogénicos en los que, bien la punta o todo el catéter, es fácilmente observado en la ecografía.

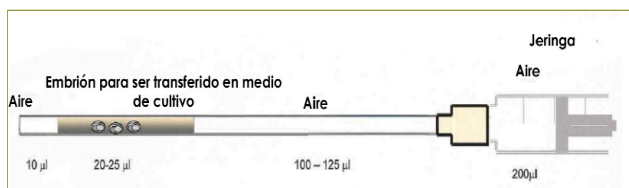
Aunque se han estudiado numerosos aspectos técnicos para minimizar las complicaciones producidos por el catéter (trauma endometrial, inducción de contracciones uterinas,

depósito de los embriones en una ubicación subóptima, o los daños causados a los embriones durante el proceso) y determinar su efecto sobre el resultado del embarazo, la evaluación estadística aún no está clarificada por la confusión existente entre las numerosas variables que se incluyen en el proceso de FIV

Actualmente han sido comercializados numerosos catéteres, de forma que la elección del catéter a emplear ha alcanzado relativa relevancia.

En el caso de que la paciente sea conocida, bien por haber sido previamente transferida o porque le fue practicada una transferencia de prueba, deben existir datos en la historia clínica que permitan conocer las características de su conducto cervical y el grado de dificultad que representa realizarle una transferencia. Esto debe facilitar la elección del catéter, que debe ser realizada conjuntamente por el ginecólogo y el embriólogo responsables de la misma.

En la preparación del catéter, normalmente una columna de líquido de unos 20  $\mu$ L rodea al embrión en su interior. La transferencia de volúmenes de más de 60  $\mu$ L puede provocar la expulsión de los embriones hacia la vagina (108), pero volúmenes inferiores a 10  $\mu$ L parecen afectar negativamente las tasas de implantación (109).



El medio líquido que contiene a los embriones está delimitado a menudo por burbujas de aire. El propósito de crear estos espacios de aire en el catéter de transferencia es el de facilitar la carga embrionaria y estabilizar su localización en el interior para evitar una pérdida accidental (108, 110). Además, se ha postulado que la posibilidad de que el moco cervical bloquee la punta del catéter y atrape los embriones en su interior se reduce por el aire, que crea un límite claro con el medio que contiene los embriones (105). La inyección adicional de una cantidad de 50  $\mu$ L de aire tras haber inyectado el contenido del catéter, contribuye a su limpieza y evita que el embrión pueda quedarse atrapado en su interior (111). Un trabajo publicado por Moreno (112) que enfrenta 50 transferencias con aire versus 52 transferencias sin aire, no encontró ninguna ventaja en la supresión del espacio aéreo.

Como la interfase aire-líquido es fácilmente visualizada en la ecografía, su presencia constituye una ayuda muy útil en la UG-TE.

Los medios comerciales donde se alojan los embriones están principalmente compuestos de varias concentraciones de los iones, aminoácidos y carbohidratos. No se ha demostrado que la concentración de proteínas o la viscosidad del medio de transferencia afecten al resultado (113, 114). Un sellador de fibrina agregado al medio ha demostrado beneficio sólo en las pacientes mayores (115, 116). Recientemente, se ha incorporado el hialuronano al medio de la transferencia. Se trata de un glicosaminoglicano presente en todo el tracto reproductor femenino, que teóricamente podría tener efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario temprano e implantación). Aunque este beneficio no fue observado en otro RCT de 815 pacientes (117). En un RCT con 1.282 pacientes, el medio enriquecido con hialuronano (EmbryoGlue; Vitrolife, Englewood, CO) mejoró significativamente el PR clínico (54,6% vs 48,5%, OR 1,28) y las tasas de implantación (32% vs 25%, OR 1,43) (118). Otro ensayo clínico sobre 101 pacientes con más de cuatro fallos de transferencia anterior, si demostró un incremento RP (31,3% vs 4,0%,  $P=0,0005$ ) con hialuronano, sugiriéndose que esta sustancia puede proporcionar un beneficio en un grupo selecto de pacientes (119).

Un metanálisis a partir de las publicaciones que recogen estudios controlados randomizados comparando los resultados del empleo de medios aditivados de compuestos adherentes con medios que no los contienen (120). Se comprobó que los medios que contienen ácido hialurónico incrementan significativamente la tasa de gestación clínica (OR 1,41, 95% CI 1,22 to 1,63;  $P < 0,00001$ ) y la tasa de múltiples (OR 1,86, 95% CI 1,49 to 2,31;  $P < 0,00001$ ), aunque no la tasa de nacido vivo.

#### c.4. Depósito de los embriones

Después de comprobar la identificación de la paciente, el embriólogo carga el catéter de transferencia con los embriones y los entrega al clínico. Éste, evitando maniobras violentas, lo introduce a través del canal cervical y lo hace avanzar por la cavidad uterina, donde deposita los embriones. Tras la retirada, el catéter es entregado al embriólogo para su estudio y para descartar la posibilidad de embriones retenidos. Los interrogantes más frecuentes que se plantean sobre el depósito embrionario son los siguientes:

##### c.4.1. ¿Dónde y cómo depositarlos?

Los movimientos peristálticos de la pared uterina generan movimientos intrauterinos que sirven como vehículos de transporte cruciales durante las primeras etapas de la reproducción. Estas corrientes de flujo son las responsables de transportar al embrión de forma exitosa al lugar de la implantación cuando la ventana biológica está abierta. Un modelo computarizado de flujo peristáltico idealizado para un canal que simulaba la cavidad uterina reveló que las carac-

terísticas de flujo peristáltico en un canal cerrado se ven afectados por la motilidad de la pared, nivel de asimetría y frecuencia de la perístasis, y que las pequeñas partículas, que representan a un embrión después de ser depositado en la cavidad uterina, recirculan describiendo pequeños bucles alrededor de su ubicación inicial hasta que se aproximan a la pared y los aspectos biológicos presentes durante la ventana de implantación son estimulados. El embrión real tiene una masa finita con un tamaño de aproximadamente 0,1 mm de diámetro por lo que su transporte es más lento y dentro de una zona más reducida que el teórico modelo experimental con partículas sin masa. Estas características de transporte protegen al embrión que está programado para estar en movimiento continuo durante 4-5 días. El modelo teórico demuestra que el embrión nunca puede quedar implantado en el fondo del útero, lo que apoya la observación de que la tasa de éxitos aumenta cuando el embrión se deposita en la zona media y no en el fondo uterino, favoreciéndose la implantación en las caras anterior o posterior, y coincide con el consenso de que la punta del catéter debe ser situado a unos 2 cm del fondo (121).

Tradicionalmente, la punta del catéter era llevada hasta 5-10 mm del fondo uterino (122). Sin embargo, varios estudios recientes sugieren que transferencia más lejos del fondo puede ser ofrecer mejores resultados. Embriones depositados a menos de 5 mm del fondo ofrecen una disminución de PR y un aumento en la tasa de ectópicos (123-126). En un ensayo clínico realizado en pacientes sometidos a UG-ET, el mayor PR (60% vs 39,3%) se obtuvo cuando la distancia era de 15-20 mm en comparación con 10 mm (127). Algunos investigadores han sugerido que la ubicación deseada debe tener en cuenta la longitud de la cavidad en vez de establecer un punto fijo de referencia, tal como la distancia al fondo (128). En un estudio clínico prospectivo de cohorte el PR aumentó con la ET dirigida hacia la parte inferior del útero, sobre la mitad del segmento. Otro RCT mostró que la PR clínica y las tasas de implantación fueron similares en las regiones superior e inferior del útero, pero mejoraron significativamente cuando se hizo cerca de la porción media del útero (129).

En resumen, los datos en la literatura apoyan la ET en la segunda mitad de parte media inferior, evitando la transferencia alta en el fondo (130).

Después de la inyección de los embriones, la presión sobre el émbolo de la jeringa debe mantenerse hasta que el catéter haya sido completamente retirado del útero. Además, la envoltura externa debe estar completamente cerrada y debe retirarse simultáneamente con el catéter interior para evitar un efecto “émbolo”. Retirar el catéter poco a poco también minimiza la presión negativa.

Algunos investigadores sugieren esperar antes de retirar el catéter para que el útero puede llegar a ser estabilizado, otros, sin embargo, reportan buenos resultados con la retirada inmediata. En un RCT de 100 mujeres, un retraso de 30 segundos antes de retirada del catéter no aumentó significativamente el PR (60,8% y el 69,4%) (131).

*c.4.2. ¿Cómo influye la dificultad de la transferencia en el resultado del proceso?*

La “dificultad” de una transferencia es algo subjetivo y a menudo es usado para describir las transferencias que llevan más de 5 minutos (112), requieren un catéter más firme, causan incomodidad, o precisan de instrumentación adicional.

Ocasionalmente, se hace muy difícil, incluso imposible, colocar un catéter a través del conducto cervical. En este sentido existe una abundante literatura (130) que sugiere que la “facilidad” de la TE está positivamente correlacionada con el resultado del embarazo. Las transferencias cuando son difíciles han ofrecido unas tasas de embarazo (PR) y de implantación significativamente más bajas en comparación con las transferencias fáciles. Un amplio estudio sobre 4807 TE, reveló PR un 1,7 veces superior cuando fue ésta fácil o intermedia, respecto de las difíciles ( $P < .0001$ ) (132), fue comunicado que tras transferencias difíciles se observa menores tasas de gestación (4%) e implantación (1%) que tras transferencias consideradas fáciles (20% y 6%, respectivamente) (132).

En estos casos, se puede recurrir a suspender la transferencia y vitrificar los embriones para proceder en otro momento a dilatar el cérvix, o colocar una laminaria o similar. Puede pasarse un estilete maleable y después pasar la vaina externa de un catéter para luego pasar el catéter blando.

Broussin y cols revisaron las consecuencias de la dilatación cervical sobre el resultado en términos de gestación (133). Tras 281 transferencias en que el conducto cervical fue dilatado, la tasa de gestación por transfer fue 17,4 % y fue necesario transferir 16,5 embriones para obtener una gestación, mientras que estos mismos parámetros fueron 25,6 % y 10,9 embriones cuando no se dilató el cuello ( $n=4.355$ ).

También se puede mantener los embriones en cultivo, practicar una histeroscopia y repetir el intento al día siguiente con mejor conocimiento del cuello.

La presencia de sangre en el catéter, a menudo causada por una transferencia difícil, también se asocia con disminución de la PR y una mayor incidencia de embriones retenidos en el catéter (134).

Uno de los mecanismos por los cuales una TE difícil o trau-

mática puede dificultar la implantación sería a través de la estimulación de las contracciones uterinas (89, 134). Fue puesto de manifiesto que la frecuencia de las contracciones uterinas en torno al día de transferencia guarda relación inversa con el nivel circulante de progesterona y que a mayor frecuencia de las contracciones menores tasas de implantación y embarazo (135). Las contracciones aumentan su frecuencia como consecuencia de una transferencia dificultosa o por el uso de una pinza de Pozzi (136). Las contracciones pueden ser iniciadas por el contacto del catéter con el fondo uterino o la manipulación cervical a través de la liberación de prostaglandinas (PG) y la oxitocina (89, 137).

Las razones más comunes para una transferencia difíciles son estenosis y sinequias del cuello uterino, patología uterina asociada, o un alto grado de anteversión / retroversión o anteflexión / retroflexión del útero. Varias técnicas, como las que incluyen el llenado vesical, la transferencia de prueba, la transferencia ecoguiada y el uso de un catéter blando se asocian con mayor facilidad de TE (130).

Si se considera que se tiene la habilidad y la experiencia necesarias puede intentarse la transferencia transmiometrial (TETM). La TETM es un método alternativo a los convencionales y puede ser útil en pacientes con insuficiencia cervical, estenosis o con historia de varios ciclos de FIV en los que las transferencias fueron extremadamente difíciles.

El procedimiento, conocido como método Towako, se realiza usando una sonda ecográfica endovaginal. Una aguja especial (K-TTET-18-32-5; William A. Cook, Stanley, Australia) con su estilete unido al soporte de la sonda vaginal se inserta transmiometrialmente y es guiada ecográficamente hacia la cavidad endometrial. Después se retira el estilete, y un catéter de transferencia de carga con embriones se pasa a través de la aguja.

Kato et al. (138) presentó su experiencia de 4 años con este método en 1.298 casos con un 44,9% de PR en transferencias de embriones obtenidos mediante ICSI. Más recientemente, Groutz et al. (139) no encontraron ningún beneficio en PR con esta técnica en casos difíciles, aunque sólo fue estudiado un pequeño grupo de pacientes (n = 40). Debido al aumento del dolor, este método debe reservarse para los casos extremadamente difíciles.

En el análisis retrospectivo ya citado realizado por Broussin y cols (133) la tasa de gestación por TETM fue del 18% y se necesitaron transferir 16 embriones para obtener una gestación.

#### *c.4.3. ¿Cómo influye el tiempo transcurrido hasta la transferencia?*

Un aspecto que se ha venido valorando como importante, es el de reducir al mínimo el intervalo de tiempo transcu-

rrido desde la carga del catéter hasta el momento en que los embriones son depositados en el útero. Los embriones pueden ser vulnerables cuando se exponen a la temperatura ambiente, a la luz, o a otros agentes en el catéter. Un intervalo más de 120 segundos se ha demostrado que disminuye la PR y la tasa de implantación, conllevando un mal pronóstico (140). Sin embargo, la importancia de este factor no está totalmente aclarada ya que otro estudio limitado a embriones de buena calidad, no mostró ningún efecto negativo en transferencias realizadas tras 7,5 minutos (141).

#### *c.4.4. ¿Tiene utilidad hacer Transferencias de Prueba?*

La transferencia de prueba, o simulada, es aquella que se hace en cualquier momento anterior al de la transferencia actual, aunque generalmente se realiza antes de empezar la estimulación ovárica o inmediatamente antes de la transferencia.

Cuando se hace antes de la estimulación, el catéter que toca el fondo uterino permite conocer la longitud de la cavidad uterina y del canal cervical, una medición que puede ser hecha a ciegas (al tacto) o mediante una ecografía abdominal. Es importante que quede constancia del tipo de espéculo utilizado, del catéter, de la necesidad o no de la necesidad del uso de un tenáculo, así como de la dirección y la curva del catéter, ya que pueden servir para una referencia futura.

Los resultados de esta prueba también pueden servir para tomar algunas decisiones antes de la transferencia real. Por ejemplo si se observa una estenosis cervical, puede ser planificada una dilatación del cuello uterino con tiempo para que el endometrio se recupere de cualquier trauma causado, inflamación, o contaminación bacteriana. Se tiene constancia de que la dilatación de un cuello estenótico está asociada a una disminución de la PR cuando se realiza dentro de un plazo de 5 días antes de la transferencia (134, 142), pero que mejora la PR cuando la dilatación se hace varias semanas antes de la ET (143, 144).

La utilidad de esta maniobra ha sido cuestionada ya que los beneficios demostrados en un ensayo controlado aleatorio (132) no han sido posteriormente confirmados, y porque la longitud y posición del útero pueden cambiar antes de la transferencia real. Por ejemplo, un útero en retroversión durante la transferencia de prueba a menudo puede quedar en anteversión en la transferencia real por el aumento del tamaño de los ovarios estimulados alojados en el FSD (145).

La transferencia de prueba puede realizarse también en el momento de la recuperación de los ovocitos, aunque en teoría esto podría alterar la receptividad del endometrio. En un estudio retrospectivo que incluía 289 mujeres no se encontraron diferencias entre hacerla en este momento o antes

de comenzar la estimulación de la ovulación (47,6% y 48,4%), respectivamente (146).

Cuando la transferencia de prueba se realiza en el momento de la TE, suele hacerse ecoguiada procurando que la sonda sólo llegue justo hasta OCI para no perturbar el revestimiento endometrial. Si esto se logra fácilmente, el catéter se puede retirar y a continuación insertar el catéter de transferencia con los embriones cargados. Una alternativa es dejar la vaina exterior e introducir a través de ella el suave catéter interno cargado con los embriones y hacerlo avanzar para su correcta colocación. Este método, denominado como técnica de carga diferida, puede disminuir la contaminación por el moco de la sonda (147).

El valor real de la transferencia de prueba ha sido discutido (148) y quizás debería reservarse sólo para los casos en que son previsibles dificultades, tales como úteros en ante o retroflexión forzadas, cuellos con antecedentes de intervenciones, problemas en transferencias previas, etc.

#### *c.4.5. ¿Qué utilidad tiene hacer las transferencias ecoguiadas?*

Muchos clínicos utilizan el método del tacto clínico con el riesgo de un contacto accidental con el fondo o de una evaluación inexacta de la posición final del catéter. Otros continúan defendiendo la ET a una distancia fija del orificio externo (aprox. 6 cm), aunque esto no tenga en cuenta la variación en la longitud del cuello uterino o el tamaño del útero (89).

Pero desde la primera descripción de Strickler et al. en 1985 (124), numerosos estudios han evaluado el efecto de la TE ecoguiada con sonda abdominal. Una revisión de Cochrane de 2010 (149), con 17 RTC que comparaba el ultrasonido frente al toque clínico concluyó que con el ultrasonido se incrementó el PR (441/1254 vs 350/1218, odds ratio [OR] 1,38, IC 95% 1,16-1,64,  $p < 0,0003$ ) (15). Otros tres meta-análisis de RTC mostraban conclusiones similares (150-152).

La transferencia ecoguiada se ha asociado con una incidencia menor de embarazos ectópicos (EP) en algunos trabajos (153, 154), aunque no en otros (146, 156).

Los argumentos postulados para justificar su ventaja se basan en la reducción de los factores potencialmente adversos. Los datos disponibles en la actualidad podemos resumirlos como sigue:

- a) Disminuir la colocación incorrecta de los embriones dentro de la cavidad uterina o la de embriones fuera de la cavidad uterina

En una serie de más de 200 mujeres, el 25% tenían una distancia entre OCE y fondo uterino de 6 cm y el 10% de más de 8 cm (157). Si los embriones fueran transferidos rutinariamente a los 6 cm del OCE, la sonda tocaría el fondo en

el primer grupo, y los embriones se depositarían a  $>2$  cm del fondo en el segundo. En relación con estos hechos se puede llegar a la conclusión de que incluso si la TE ecoguiada no beneficiase a la mayoría de las mujeres, podría ser de gran beneficio para aquellas que no cumplen con la media de la población. Cuando se evaluó mediante ecografía vaginal la colocación del catéter en una TE no ecoguiada, la punta estaba cerca de la apertura de la trompa de Falopio en 7,4%, contigua al fondo en el 17,4% y debajo de la superficie endometrial en el 24,8% (4) (124).

- b) Disminuir las transferencias difíciles

La identificación de patología uterina asociada, malformaciones o desviaciones anatómicas del útero pueden ser evidenciadas y adaptar la transferencia a las mismas, minimizando su dificultad y los traumas sobre endometrio y sangrado. Es posible que las técnicas complementarias asociadas al uso de la ecografía contribuyan en parte a su éxito. La ecografía abdominal requiere el llenado vesical y una vejiga llena durante la transferencia ecoguiada no sólo facilita la visualización del canal cervical y del endometrio, sino que además facilita el abordaje del OCI por la disminución de la ante-flexión (150, 158, 159).

Las desventajas del ultrasonido pueden derivarse de la necesidad de un segundo operador y de tratarse de un procedimiento más largo en el tiempo, además del inconveniente del llenado de la vejiga del paciente. Algunos investigadores han sugerido que mover el catéter para identificar su ubicación (un movimiento que no es necesario en las transferencias realizadas por "tacto clínico") podría alterar el endometrio (153). Sin embargo, este movimiento es por lo general innecesario con los actuales catéteres ecogénicos.

- c) Valorar por última vez los ovarios

Y también la presencia de líquido en cavidad peritoneal o suspender la transferencia en caso necesario, v.g. riesgo de hiperestimulación ovárica.

Puede afirmarse que la transferencia ecoguiada ha supuesto un importante avance en reproducción asistida.

#### *c.4.6. ¿Es conveniente tener la vejiga llena durante la TE?*

Sallam et al (160) demostraron que la tasa de embarazo después de la ET se asociaba inversamente con el grado de ante-flexión uterina.

En un ensayo pseudorandomizado, se observó una mayor tasa de embarazo en dos grupos similares de pacientes cuando la transferencia se realizó con una distensión vesical en comparación con la vejiga vacía (26,8% vs 16,6%,  $P < 0,01$ ) y se estimó que era el resultado de una mayor facilidad de la transferencia (158).

En otro ensayo aleatorizado de 171 pacientes (159) comparando UG-ET con o sin la vejiga llena, versus la transferencia tradicional con o sin llenado vesical, se observó el llenado vesical se asociaba a una menor manipulación adicional del cuello. Por ello hay quien opina que la TE ecoguiada con o sin vejiga llena deben considerarse como entidades diferentes. La ecografía transabdominal, a pesar del llenado vesical, puede no ser suficientemente orientativa en el 10% de los pacientes (153).

#### *c.4.7. ¿Tiene utilidad la Ecografía 3D/4D en la transferencia ecoguiada?*

La enseñanza de la TE está llena de preocupación debido a la naturaleza esencial de este paso. La TE se puede aprender y la ecografía puede tranquilizar durante la formación (al paciente y mentor) mostrando que la transferencia se realiza correctamente (161). Se ha tratado de extender el método ecográfico utilizando ecografía 3D y 4D (162,163) o la ecografía vaginal (164) con resultados alentadores, sin embargo, la calidad de la mayoría de todos estos los estudios está limitada por una insuficiente asignación al azar, baja potencia estadística y una información no estandarizada de los resultados. En la actualidad, la ecografía tridimensional no ha demostrado ser un factor crítico para optimizar el éxito ya que posee el inconveniente común a la ecografía convencional de la limitación del conocimiento del sitio ideal para transferir. ¿Y, quizás, a que no aporta nada en este caso?.

#### **c.5. Embriones retenidos y expulsados**

Después de la transferencia, el catéter debe ser entregado al embriólogo para su lavado e inspección con el objeto de determinar si quedó algún embrión retenido y, en este caso, ser debidamente recargado para su transferencia. Esto es a menudo una causa de preocupación, pero los pacientes deben estar seguros de que el efecto sobre el embarazo de los embriones retenidos en el catéter de transferencia no es significativo (165, 166).

La expulsión a las trompas por efecto de las contracciones puede dar lugar a una gestación ectópica o heterotópica pero la expulsión del útero a través del cuello no puede ser comprobada.

#### **c.6. ¿Conviene hacer reposo tras la TE?**

En la actualidad, la transferencia de embriones se ha convertido en un procedimiento ambulatorio pero históricamente los pacientes han guardado diferentes periodos de reposo en cama después de la transferencia y se les ha instado a una disminución de la actividad física, pensando que esto podría mejorar la retención del embrión en la cavidad uterina.

El reposo en cama ha sido recomendado a las mujeres desde el inicio de la FIV. Algunos autores aconsejaban permanecer

en decúbito prono durante 4 horas (167) y otros, incluso alargaban este tiempo aconsejando permanecer en cama durante las 18-24 horas siguientes (168). En 1988, Waterstone (169) ya informaba que el reposo en cama era anatómicamente irracional y que era aconsejable que las mujeres continuaran con su actividad normal tras la TE.

En 1995 Sharif (170) comprobó que los mejores resultados se daban en mujeres que deambularon inmediatamente a la transferencia (23,5% vs 18,6%). Estudiando la interfase aire-líquido en la ecografía, Woolcott y Stanger comprobaron que ponerse en pie inmediatamente después de la transferencia no producía ningún desplazamiento embrionario en el 94% de los casos, era inferior a 1 cm en el 4%, y más de 4 cm en el 2% (126). Estos autores comprobaron que deambular después de la TE no modificaba significativamente la posición final del embrión (171, 172).

Otro estudio prospectivo en Taiwán (173) que registró la actividad diaria en las mujeres después de la TE llegó a la conclusión de que el reposo en cama no se correlacionó con la FIV exitosa y que la mayoría de los sujetos mostraron una gran iniciativa en restringir sus actividades diarias, aunque sus médicos les aconsejaron volver a sus rutinas normales. Un estudio prospectivo dirigido por Bar-Hava en 2005 (174) confirmó que la deambulación inmediata a la TE no disminuía las tasas de embarazo y que el porcentaje de éxito era superior en las que deambulaban inmediatamente que en las que permanecían en reposo durante una hora (24,55% vs. 21,34%). El reposo breve en cama (30 minutos) tampoco ha demostrado beneficio sobre la deambulación inmediata en un ensayo clínico de 164 pacientes (47,0% vs 51,0%, OR 0,85; IC 95% 0,39-1,85) (175). Y en una revisión sistemática considerando diversos intervalos de reposo (desde 0 vs. 30 minutos y 20-60 minutos vs. 24 horas), se concluyó también que el reposo prolongado en cama no mejoró el resultado (176) del procedimiento de fecundación in vitro.

También fue descartado que el hecho de mantener relaciones sexuales durante las horas que preceden y siguen a la transferencia influyera en el resultado (177).

Todos estos resultados podrían ser explicados porque los movimientos peristálticos existentes en la cavidad uterina, debido a las contracciones hacia el fundus, bloquean a los embriones dentro de un área pequeña alrededor del lugar donde fueron depositados, haciendo innecesario el reposo (178).

El uso racional de la información disponible hasta la fecha nos debe hacer recomendar la deambulación precoz (179) sabiendo que las mujeres van a restringir su actividad durante este periodo como una respuesta compensatoria al estrés acumulado durante el periodo de tratamiento.

## CONTROL DE LAS TRANSFERENCIAS

Parece recomendable que los equipos médico-biológicos recojan la mejor información posible de todas las transferencias realizadas, a ser posible de forma informatizada, con el fin de valorar el rendimiento que los distintos catéteres, medios y circunstancias de cada caso dan como resultado, en términos de tasas de gestación e implantación (180).

En resumen, respecto a la técnica de la transferencia, parece poder afirmarse:

La transferencia embrionaria en una maniobra importante, que requiere atención y que debe ser preparada por el equipo-médico biológico con la mayor atención.

Durante la transferencia debe evitarse el uso de tenáculos, el contacto con el endometrio y cualquier otra posible causa de desencadenar contracciones uterinas.

Una transferencia de prueba rutinaria no parece ser necesaria pero puede ser recomendable ante pacientes con cuellos potencialmente complicados.

Es preferible el uso de catéteres suaves, aunque, en ocasiones, pueden ser necesarios catéteres más rígidos e incluso dilatar el cuello. Si la dilatación del cuello se hace necesaria, los embriones deben ser criopreservados y transferidos en otro momento alejado de la dilatación.

La transferencia debe ser ecoguiada.

No existen evidencias científicas que apoyen la necesidad de reposo tras la transferencia, aunque nada se opone a un corto periodo de decúbito.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Hartshome G, Edwards R.** Role of embryonic factors in implantation: recent developments. *Bailliere's Clin Obstet Gynecol.* 1991; 5: 133 - 58.
2. **Paulson R, Sauer M, Lobo R.** Embryo implantation after human in vitro fertilization: importance of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 1990; 53:870 - 4.
3. **Schoolcraft W, Surrey E, Gardner D.** Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril.* 2001; 76:863 - 70.
4. **Velasquez L, Maisey K, Fernandez R, Valdes D, Cárdenas H, Imarai M, et al.** PAF receptor and PAF acetylhydrolase expression in the endosalpinx of the human fallopian tube: possible role of the embryo-derived PAF in the control of embryo transport to the uterus. *Hum Reprod.* 2001; 16:1583 - 7.
5. **Edwards R, Purdy J, Steptoe P, Walters D.** The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 1981; 141:408 - 16.
6. **Gardner D, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft W.** Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril.* 1998;69:84 - 8.
7. **Edwards R, Fishel S, Cohen J, Fehilly C, Purdy J, Slater J, et al.** Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J. In Vitro Fert Embryo Transf.* 1984;1:3 - 23.
8. **Quinn P, Warnes G, Kerin J, Kirby C.** Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril.* 1984;41:202 - 9.
9. **Gronow M, Martin M, McBain J, Wein P, Speirs A, Lopata A.** Aspects of multiple embryo transfer. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;442:381 - 6.
10. **Speirs A, Lopata A, Gronow M, Kellow G, Johnston W.** Analysis of the benefits and risks of multiple embryo transfer. *Fertil Steril.* 1983;39:468 - 71.
11. **ASEBIR.** Cuadernos de embriología clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2ª ed. Madrid: Gobalo; 2008.
12. **Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryologist.** The Istanbul Consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*, Vol. 26 NO 6 pp. 1270-1283, 2011.
13. **Veeck LI.** Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Acad Sci* 1988; 541:259. Veeck LI. Oocyte quality and assisted conception. *Acta Eur Fertil* 1992; 23: 275-278.
14. **Laufer N, Tarlatzis BC, Decherney AH et al.** Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; 42:366.
15. **Veeck LI.** The morphologic estimation of mature oocytes and their preparation for insemination. En *In vitro fertilization- Norfolk*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1986; 81.
16. **Cuadros J.** Estado actual del grupo de Interés de Calidad Embrionaria. Actualidad de la clasificación de ASEBIR. *Rev. Asebir.* Dic. 2009; 14: 10-12.
17. **Gardner Dk, Schoolcraft WB, Schlenker J, Hesla J.** A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod* 1998; 13:3434-3440.
18. **Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, et al.** Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2001; 16: 1115-1119.
19. **Paternot G, Debrock S, De Neubourg D, D'Hooghe TM, Spiessens C.** Semi-automated morphometric analysis of human embryos can reveal correlations between total embryo volume and clinical pregnancy. *Hum Reprod.* 2013 Jan 12.
20. **Buster J, Bustillo M, Rodi I, Cohen S, Hamilton M, Simon J.** Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;153:211 - 17.
21. **Huisman G, Alberda A, Leerentveld R, Verhoeff A, Zeilmaker G.** A comparison of in vitro fertilization results after embryo transfer after 2, 3 and 4 days of embryo culture. *Fertil Steril.* 1994;61:970 - 1.
22. **Alves da Motta E, Alegretti J, Baracat E, Olive D, Serafini P.** High implantation and pregnancy rates with transfer of human blastocysts developed in preimplantation stage one and blastocyst media. *Fertil Steril.* 1998;70(4):659 - 63.
23. **Scholtes M, Zeilmaker G.** Blastocyst transfer in day-5 embryo transfer depends primarily on the number of oocytes retrieved and not on age. *Fertil Steril.* 1998;69:78 - 83.
24. **Milki A, Fish J, Behr B.** Two-blastocyst transfer has similar pregnancy rates and a decreased multiple gestation rate compared with three-blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 1999;72(2):225 - 8.
25. **Milki A, Hinkley M, Fisch J, Dasig D, Behr B.** Comparison of blas-

- tocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril*. 2000;73:126–9.
26. **Racowsky C, Jackson K, Cekleniak N, Fox J, Hornstein M, Ginsburg E.** The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril*. 2000;73:558–64.
  27. **Shapiro B, Harris D, Richter K.** Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertil Steril*. 2000;73:582–6.
  28. **Hreinsson J, Rosenlund B, Fridström M, Ek I, Levkov L, Sjöblom P, et al.** Embryo transfer is equally effective at cleavage stage and blastocyst stage: a randomized prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;117:194–200.
  29. **Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A.** Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jul 11;7:CD002118. doi: 10.1002/14651858.CD002118.pub4.
  30. **Cobo A, de los Santos MJ, Castellò D, Gámiz P, Campos P, Remohí J.** Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril*. 2012 Nov;98(5):1138–46.
  31. **Sharma V, Riddle A, Mason B, Pampiglione J, Campbell S.** An analysis of factors influencing the establishment of a clinical pregnancy in an ultrasound-based ambulatory in vitro fertilization program. *Fertil Steril*. 1988;49(3):468–78.
  32. **Azem F, Yaron Y, Amit A, et al.** Transfer of six or more embryos improves success rates in patients with repeated in vitro fertilization failures. *Fertil Steril*. 1995;63:1043–6.
  33. **Beral V, Doyle P, Tan S, Mason B, Campbell S.** Outcome of pregnancies resulting from assisted conception. *Br Med Bull*. 1990;46:753–68.
  34. **Guyer B, MacDorman M, Martin J, Peters K, Strobino D.** Annual summary of vital statistics—1997. *Pediatrics*. 1998;102:1333–49.
  35. **Jones HJ, Schnorr J.** Multiple pregnancies: a call for action. *Fertil Steril*. 2001;75:11–3.
  36. **Centers for Disease Control.** 1997 assisted reproductive technology success rates, national summary and fertility clinics reports. Atlanta: Centers for Disease Control; 1999.
  37. **Centers for Disease Control.** Contribution of Assisted Reproductive Technology and Ovulation-Inducing Drugs to Triplet and Higher-Order multiple Births—United States, 1980–1997. Atlanta: Centers for Disease Control, 2001.
  38. **Monzó A, Gilabert-Estellés J, Romeu A.** Estrategias para evitar las gestaciones múltiples en inducción de ovulación. In: Gratacós E, Romeu A, editors. *Gestación múltiple Problemáticas actuales en medicina reproductiva y perinatología*. Madrid: Ed. Médica; 2004. p. 19–39.
  39. **Gil-Raga F.** Optimización de los protocolos de hiperestimulación ovárica controlada para FIV/ICSI en pacientes diagnosticadas de síndrome de ovarios poliquísticos [Investigación clínica]. Valencia: Universidad de Valencia; 2009.
  40. **Arlettaz R, Paraskevopoulos E, Bucher H.** Triplets and quadruplets in Switzerland: comparison with singletons, and evolution over the last decade. *J Perinat Med*. 2003;31:242–50.
  41. **Crosignani P, Rubin B.** Multiple gestation pregnancy. The Eshre Capri Workshop Group. *Hum Reprod*. 2000;15:1856–64.
  42. **Gleicher N, Campbell D, Chan C, Karande V, Rao R, Balin M, Pratt D.** The desire for multiple births in couples with infertility problems contradicts present practice patterns. *Hum Reprod*. 1995;10:1079–84.
  43. **Brahams D.** Assisted reproduction and selective reduction of pregnancy. *Lancet*. 1987;2:1409–10.
  44. **Gonen Y, Blankier J, Casper R.** Transvaginal ultrasound in selective embryo reduction for multiple pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1990;75:720–2.
  45. **Fasouliotis S, Schenker J.** Multifetal pregnancy reduction: a review of the world results for the period 1993–1996. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1997;75:183–90.
  46. **Committee on Ethics.** Nonselective embryo reduction: ethical guidance for the obstetrician-gynecologist. American College of Obstetrics and Gynecologists. ACOG Committee Opinion, 1999 April. Report No.
  47. **Dickens B, Cook R.** Some ethical and legal issues in assisted reproductive technology. *Int J Gynecol Obstet*. 1999;66:55–61.
  48. **Papiernik E, Grange G, Zeitlin J.** Should multifetal pregnancy reduction be used for prevention of preterm deliveries in triplet or higher order multiple pregnancies? *J Perinat Med*. 1998;26:365–70.
  49. **Athanasiadis A, Karavida A, Tzitzimikas S, Vavilis D, Grimbizis G, Tarlatzis B, et al.** Fetal reduction in a nontuplet pregnancy: technical and ethical considerations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005;120:227–9.
  50. **Leach R, Ney J, Ory S.** Selective embryo reduction of an interstitial heterotopic gestation. *Fetal Diagn Ther*. 1992;7:41–5.
  51. **Coetsier T, Dhont M.** Embryo transfer and multiple gestation. Avoiding multiple pregnancies in in-vitro fertilization: who's afraid of single embryo transfer? *Hum Reprod*. 1998;13:2663–70.
  52. **Fujii S, Fukui A, Yamaguchi E, Sakamoto T, Sato S, Saito Y.** Reducing multiple pregnancies by restricting the number of embryos transferred to two at the first embryo transfer attempt. *Hum Reprod*. 1998;13:3550–4.
  53. **Templeton A, Morris JK.** Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. *N Engl J Med* 1998;339:573–577.
  54. **Vilksa S, Tiitinen A, Hydén-Granskog C, Hovatta O.** Effective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Hum Reprod* 1999;14:2392–2395.
  55. **Strandell A, Bergh C, Lundin K.** Selection of patients suitable for one-embryo transfer may reduce the rate of multiple births by half without impairment of overall birth rates. *Hum Reprod*. 2000;15:2520–5.
  56. **ESHRE.** ESHRE ART fact sheet. <http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Guidelines-Legal/ART-fact-sheet/page.aspx/1061>.
  57. **THL.** Assisted Fertility treatments 2010–2011. Statistical Report and Appendices. [www.thl.fi/en\\_US/web/en/statistics/topics/reproductive\\_health/assisted\\_fertility\\_treatments](http://www.thl.fi/en_US/web/en/statistics/topics/reproductive_health/assisted_fertility_treatments).
  58. **McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neubourg D, Dumoulin JC, Gerris J, Kremer JA, Martikainen H, Mol BW et al.** Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *BMJ* 2010;341:c6945.
  59. **Pandian Z, Bhattacharya S, Ozturk O, Serour G, Templeton A.** Number of embryos for transfer following in-vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Apr 15;(2):CD003416.



60. de Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, Kupka M, Nygren KG, Andersen AN. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2012;27:954-966.
61. Scotland GS, McLernon D, Kurinczuk JJ, McNamee P, Harrild K, Lyall H, Rajkhowa M, Hamilton M, Bhattacharya S. Minimising twins in in vitro fertilisation: a modelling study assessing the costs, consequences and cost-utility of elective single versus double embryo transfer over a 20-year time horizon. *BJOG*. 2011 Aug;118(9):1073-83. doi: 10.1111/j.1471-0528.2011.02966.x. Epub 2011 Apr 8.
62. Kresowik JD, Sparks AE, Van Voorhis BJ. Clinical factors associated with live birth after single embryo transfer. *Fertil Steril*. 2012 Nov;98(5):1152-6.
63. Niinimäki M, Suikkari A-M, Makinen S, So derstrom-Anttila V, Martikainen H. Elective single embryo transfer in women aged 40 to 44 years. *Hum Reprod*. 2013 Feb;28(2):331-5.
64. Gleicher N. The irrational attraction of elective single-embryo transfer (eSET). *Hum Reprod*. 2013 Feb;28(2):294-7.
65. Schieve LA, Peterson HB, Meikle SF, Jeng G, Danel I, Burnett NM, Wilcox LS. Live-birth rates and multiple-birth risk using in vitro fertilization. *JAMA* 1999;282:1832-1838.
66. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Criteria for number of embryos to transfer: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013 Jan; 99 (1):44-46. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.038. Epub 2012 Oct 22.
67. Seif M, Pearson J, Ibrahim Z, et al. Endometrium in in vitro fertilization cycles: morphological and functional differentiation in the implantation phase. *Hum Reprod*. 1992;7:6-11.
68. Lessey B, Glasser S. Endometrial receptivity. In: Aplin J, Fazleabas A, Glasser S, Giudice L, editors. *The endometrium Molecular, cellular, and clinical perspectives*. London: Informa Healthcare; 2008. p. 305-18.
69. Navot D, Scott RJ, Drosch K, et al. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril*. 1991;55:114-8.
70. Wilcox A, Baird D, Weinberg C. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med*. 1999;340:1796-9.
71. Younis J, Ezra Y, Sherman Y, Simon A, Schenker J, Laufer N. The effect of estradiol depletion during the luteal phase on endometrial development. *Fertil Steril*. 1994;62:103-7.
72. Noyes R, Hertig A, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril*. 1950;1:3-25.
73. Coutifaris C, Myers E, Guzik D, Diamond M, Carson S, Legro R, et al. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril*. 2004;82:1264-72.
74. Aplin J. The cell biology of human implantation. *Placenta*. 1996;17:269-75.
75. Croxatto H, ME O, Díaz S, Hess R, Balmaceda J, Croxatto H. Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;132:629-34.
76. Buster J, Bustillo M, Rodi I, Cohen S, Hamilton M, Simon J, et al. Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. *Am J Obstet Gynecol*. 1985;153:211-7.
77. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O, Landgren B. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril*. 2003;79 Suppl 1:808-14.
78. Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Berndt S, Dubois M, Munaut C, Goffin F, et al. Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. *Hum Reprod*. 2004;19:2633-43.
79. Huang H, Raga F, Wen Y, Kruessel J, Soong Y, Polan M. Interleukin-1beta regulation of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in cultured human endometrial stromal cells. *Fertil Steril*. 2003;79:399-406.
80. Raga F, Casañ E, Bonilla-Musoles F. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I regulation of interleukin (IL)-1b and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stromal cells. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008;34:464-72.
81. Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Luteinizing hormone affects uterine receptivity independently of ovarian function. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:59-64.
82. Cameo P, Szmidi M, Strakova Z, Mavrogianis P, Sharpe-Timms K, Fazleabas A. Decidualization regulates the expression of the endometrial chorionic gonadotropin receptor in the primate. *Biol Reprod*. 2006;75:681-9.
83. Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L. Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocrinol*. 2007;269:85-92.
84. Thomas K, Thomson A, Wood S, Kingsland C, Vince G, Lewis-Jones I. Endometrial integrin expression in women undergoing in vitro fertilization and the association with subsequent treatment outcome. *Fertil Steril*. 2003;80:502-7.
85. Ordi J, Creus M, Quinto L, Casamitjana R, Cardesa A, Balasch J. Within-subject between-cycle variability of histological dating, alpha v beta 3 integrin expression, and pinopod formation in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2118-25.
86. Natri CO, Gibreel A, Raine-Fenning N, Maheshwari A, Ferriani RA, Bhattacharya S, Martins WP. Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jul 11;7:CD009517. doi: 10.1002 / 14651858. CD009517. pub2.
87. Desparois A, Capelle M, Banet J, Noizet A, Gamarre M, Courbière B. Does the experience of the provider affect pregnancy rates after embryo transfer? *J Reprod Med*. 2011 Sep-Oct;56(9-10):437-43.
88. Strickler RC, Christianson C, Crane JP, Curato A, Knight AB, Yang V. Ultrasound guidance for human embryo transfer. *Fertil Steril* 1985;43:54-61.
89. Lesny P, Killick SR, Tetlow RL, Robinson J, Maguiness SD. Embryo transfer— can we learn anything new from the observation of junctional zone contractions? *Hum Reprod* 1998;13:1540-6.
90. Egbase PE, Al-Sharhan M, Grudzinskas JG. Influence of position and length of uterus on implantation and clinical pregnancy rates in IVF and embryo transfer treatment cycles. *Hum Reprod* 2000;15:1943-6.
91. Kroon B, Hart RJ, Wong BM, Ford E, Yazdani A. Antibiotics prior to embryo transfer in ART. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Mar 14;3:CD008995. doi: 10.1002/14651858.CD008995.pub2.
92. Fanchin R, Righini C, de Ziegler D, Olivennes F, Ledee N, Frydman R. Effects of vaginal progesterone administration on uterine contractility at the time of embryo transfer. *Fertil Steril* 2001;75:1136-40.
93. Egbase P, al-Sharhan M, al-Othman S, al-Mutawa M, Udo E, Grudzinskas J. Incidence of microbial growth from the tip of the embryo transfer catheter after embryo transfer in relation to clinical pregnancy rate following in vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod*. 1996;11:1687-9.
94. McNamee P, Huang T, Carwile A. Significant increase in pregnancy rates achieved by vigorous irrigation of endocervical mucus prior to embryo transfer with a Wallace catheter in an IVF-ET program [Abstract]. *Fertil Steril* 1998;70 Suppl 1:S228.70(Suppl 1):S228.
95. Moini A, Kiani K, Bahmanabadi A, Akhond M, Akhlaghi A. Improvement in pregnancy rate by removal of cervical discharge prior to embryo transfer in ICSI cycles: a randomised clinical trial. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2011 Aug;51(4):315-20.
96. Visschers BA, Bots RS, Peeters MF, Mol BW, van Dessel JH. Re-

- removal of cervical mucus: effect on pregnancy rates in IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online* 2007;15:310-5.
97. **Moragianni VA, Cohen JD, Smith SE, et al.** Effect of macroscopic or microscopic blood and mucus on the success rates of embryo transfers. *Fertility and Sterility* 2010;3:570-3.
  98. **Tiras B, Korucuoglu U, Polat M, Saltik A, Zeyneloglu HB, Yarali H.** Effect of blood and mucus on the success rates of embryo transfers. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012 Dec;165(2):239-42.
  99. **Goudas V, Hammitt D, Damarico M, Session D, Singh A, Dumesic D.** Blood on the embryo transfer catheter is associated with decreased rates of embryo implantation and clinical pregnancy with the use of in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 1998;70:878-82.
  100. **Wood EG, Batzer FR, Go KJ, Gutmann JN, Corson SL.** Ultrasound-guided soft catheter embryo transfers will improve pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000;15:107-12.
  101. **McDonald JA, Norman RJ.** A randomized controlled trial of a soft double lumen embryo transfer catheter versus a firm single lumen catheter: significant improvements in pregnancy rates. *Hum Reprod* 2002; 17:1502-6.
  102. **Sallam HN, Agameya AF, Rahman AF, Ezzeldin F, Sallam AN.** Impact of technical difficulties, choice of catheter, and the presence of blood on the success of embryo transfer: experience from a single provider. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:135-42.
  103. **Abou-Setta AM, Al-Inany HG, Mansour RT, Serour GI, Aboulghar MA.** Soft versus firm embryo transfer catheters for assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2005;20:3114-21.
  104. **Bucket W.** A review and meta-analysis of prospective trials comparing different catheters used for embryo transfer. *Fertil Steril* 2006;85:728-34.
  105. **Urman B, Aksoy S, Alatas C, Mercan R, Nuhoglu A, Isiklar A, et al.** Comparing two embryo transfer catheters. Use of a trial transfer to determine the catheter applied. *J Reprod Med* 2000; 45:135-8.
  106. **Saldeen P, Abou-Etta A, Bergh T, Sundstrom P, Holte J.** A prospective randomized controlled trial comparing two embryo transfer catheters in an ART program. *Fertil Steril* 2008; 90:599-603.
  107. **Silverstein T, Weitzen S, Franfurter D, Trimarchi F, Keefe D, Plosker F.** Cannulation of a resistant internal os with the malleable outer sheath of a coaxial soft embryo transfer catheter does not affect in vitro fertilization-embryo transfer outcome. *Fertil Steril.* 2004; 82:1402-6.
  108. **Poindexter AN, Thompson DJ, Gibbons WE, Findley WE, Dodson MG, Young RL.** Residual embryos in failed embryo transfer. *Fertil Steril* 1986; 46:262-7.
  109. **Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Polz W, Tews G.** The ineffective loading process of the embryo transfer catheter alters implantation and pregnancy rates. *Fertil Steril* 2001;76:630-2.
  110. **Krampl E, Zegermacher G, Eichler C, Obruca A, Strohm H, Feichtinger W.** Air in the uterine cavity after embryo transfer. *Fertil Steril* 1995;63:366-70.
  111. **Jones HW Jr, Acosta AA, Garcia JE, Sandow BA, Veek L.** On the transfer of conceptuses from oocytes fertilized in vitro. *Fertil Steril* 1983;39:241-3.
  112. **Moreno V, Balasch J, Vidal E, Calafel JM, Civico S, Vanrell JA.** Air in the transfer catheter does not affect the success of embryo transfer. *Fertil Steril* 2004; 81:1366-70.
  113. **Khan I, Staessen C, Devroey P, Van Steirteghem AC.** Human serum albumin versus serum: a comparative study on embryo transfer medium. *Fertil Steril* 1991; 56:98-101.
  114. **Menezo Y, Arnal F, Humeau C, Ducret L, Nicolle B.** Increased viscosity in transfer medium does not improve the pregnancy rates after embryo transfer. *Fertil Steril* 1989; 52:680-2.
  115. **Feichtinger W, Strohm H, Radner KH, Goldin M.** The use of fibrin sealant for ET: development and clinical studies. *Hum Reprod* 1992; 7:890-3.
  116. **Ben-Rafael Z, Ashkenazi J, Shelef M, Farhi J, Voliovitch I, Feldberg D, et al.** The use of fibrin sealant in in vitro fertilization and embryo transfer. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1995; 40:303-6.
  117. **Karimian L, Rezazadeh VM, Baghestani AR, Moeini A.** A prospective randomized comparison of two commercial embryo transfer medium in IVF/ ICSI cycles. *Hum Reprod* 2004;19(Suppl 1):52.
  118. **Urman B, Yakin K, Ata B, Isiklar A, Balaban B.** Effect of hyaluronan-enriched transfer medium on implantation and pregnancy rates after day 3 and day 5 transfers: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2008;90:604-12
  119. **Friedler S, Schacter M, Strassburger D, Esther K, Ron El R, Raziel A.** A randomized clinical trial comparing recombinant hyaluronan/recombinant albumin versus human tubal fluid for cleavage stage embryo transfer in patients with multiple IVF-embryo transfer failure. *Hum Reprod* 2007; 22:2444-8.
  120. **Bontekoe S, Blake D, Heineman M, Williams E, Johnson N.** Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;Jul 7 (7): CD007421.
  121. **Yaniv S, Jaffa AJ, Eytan O, Elad D.** Simulation of embryo transport in a closed uterine cavity model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 May;144 Suppl 1:S50-60. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.02.019. Epub 2009 Mar 17.
  122. **Jones HW.** In vitro fertilization. In: Behrman SJ, Kistner RW, Patton GW, eds. *Progress in infertility.* 3rd ed. Boston: Little, Brown, 1998:543-61.
  123. **Lesny P, Killick SR, Tetlow RL, Robinson J, Maguiness SD.** Embryo transfer—can we learn anything new from the observation of junctional zone contractions. *Hum Reprod* 1998; 13:1540-6.
  124. **Woolcott R, Stanger J.** Potentially important variables identified by transvaginal ultrasound-guided embryo transfer. *Hum Reprod* 1997; 12:963-6.
  125. **Pope CD, Cook EK, Arny M, Novak A, Grow DR.** Influence of embryo transfer depth on in vitro fertilization and embryo transfer outcomes. *Fertil Steril* 2004; 81:51-8.
  126. **Nazari A, Askari HA, Check JH, O'Shaughnessy A.** Embryo transfer technique as a cause of ectopic pregnancy in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993; 60:919-21.
  127. **Coroleu B, Barri PN, Carreras O, Martinez F, Parriego M, Me-reter L, et al.** The influence of the depth of the embryo replacement into the uterine cavity on implantation. Rates after IVF: a controlled, ultrasound guided study. *Hum Reprod* 2002;17:341-6.
  128. **Frankfurter D, Trimarchi JB, Silva CP, Keefe DL.** Middle to lower uterine segment embryo transfer improves implantation and pregnancy rates compared with fundal embryo transfer. *Fertil Steril* 2004; 81:1273-7.
  129. **Franco JG, Bai G, Prosinecki V, Abrunhosa F, Ferreira GC, Bastos M.** Best site for ET: the upper or lower half of endometrial cavity? *Hum Reprod* 2004; 19:1785-1790.
  130. **Mains L and Van Voorhis B J.** Optimizing the technique of embryo transfer. *Fertil Steril* 2010; 94:785-90.
  131. **Martinez F, Coroleu B, Parriego M, Carreras O, Belil I, Parera N, et al.** Ultrasound-guided embryo transfer: immediate withdrawal of the catheter versus a 30 second wait. *Hum Reprod* 2001; 16:871-4.
  132. **Mansour R, Aboulghar M, Serour G.** Dummy embryo transfer: a technique that minimizes the problems of embryo transfer and improves the pregnancy rate in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990; 54:678-81.
  133. **Broussin B, Jayot S, Subtil D, Parneix I, Audebert A, Dubecq F, et al.** Transferts d'embryons difficiles: l'apport de l'échographie. *Contracept Fertil Sex.* 1998;26:492 - 7.

134. Visser DS, Fourie FL, Kruger HF. Multiple attempts at embryo transfer: effects on pregnancy outcome in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *J Assist Reprod Genetics* 1993; 10:37-43.
135. Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, de Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;13:1968-74.
136. Lesny P, Killick S, Robinson J, Raven G, Maguiness S. Junctional zone contractions and embryo transfer: is it safe to use a tenaculum? *Hum Reprod*. 1998;14:2367-70.
137. Dorn C, Reinsberg J, Schlebusch H, Prietl G, van der Ven H, Krebs D. Serum oxytocin concentration during embryo transfer procedure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 87:77-80.
138. Kato O, Takatsuka R, Asch RH. Transvaginaltransmyometrial embryo transfer: the Towako method; experiences of 104 cases. *Fertil Steril* 1993; 59:51-3.
139. Groutz A, Lessing JB, Wolf Y, Azem F, Yovel I, Amit A. Comparison of transmyometrial and transcervical embryo transfer in patients with previously failed in vitro fertilization-embryo transfer cycles and/or cervical stenosis. *Fertil Steril* 1997; 67: 1073-6.
140. Matorras R, Mendosa R, Exposito A, Rodriguez- Escudero FJ. Influence of the time interval between embryo catheter loading and discharging on the success of IVF. *Hum Reprod* 2004; 19:2027-30.
141. Ciray HN, Tosum S, Hacifazlioglu O, Mesut A, Bahceci M. Prolonged duration of transfer does not affect outcome in cycles with good embryo quality. *Fertil Steril* 2007; 87:1218-21.
142. Groutz A, Yovel I, Lessing J, Azem F, Wolf Y, Amit A. Cervical dilatation during ovum pick-up in patients with cervical stenosis: effect on pregnancy outcome in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 1997; 67:909-11.
143. Glatstein IZ, Pang SC, McShane PM. Successful pregnancies with the use of laminaria tents before embryo transfer for refractory cervical stenosis. *Fertil Steril* 1997; 67:1172-4.
144. Prapas N, Prapas Y, Panagiotidis Y, Prapa S, Vanderzwalmen P, Makedos G. Cervical dilatation has a positive impact on the outcome of IVF in randomly assigned cases having two previous difficult embryo transfers. *Hum Reprod* 2004; 19:1791-5.
145. Henne MB, Milki AA. Uterine position at real embryo transfer compared with mock embryo transfer. *Hum Reprod* 2004; 19:570.
146. Katariya KO, Bates GW, Robinson RD, Arthur NJ, Propst AM. Does the timing of mock embryo transfer affect in vitro fertilization implantation and pregnancy rates? *Fertil Steril* 2007; 88:1462-4.
147. Neithardt AB, Segars JH, Hennessy S, James AN, McKeeby JL. Embryo afterloading: a refinement in embryo transfer technique that may increase clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2005; 83:710-4.
148. Henne M, Milki A. Uterine position at real embryo transfer compared with mock embryo transfer. *Hum Reprod*. 2004;19:570-2.
149. Brown JA, Buckingham K, About-Setta A, BuckettW. Ultrasound-versus "clinical touch" for catheter guidance during embryo transfer in women [review]. *The Cochrane Database Syst Rev* 2010; Jan 20(1):CD006107.
150. Sundstrom P, Wrambsy H, Person PH, Liedhom P. Filled bladder simplifies human embryo transfer. *Br J Obstet Gynecol* 1984; 91:506-7.
151. Buckett WM. A meta-analysis of ultrasound-guided versus clinical touch embryo transfer. *Fertil Steril* 2003; 80:1037-41.
152. Abou-Setta AM, Mansour RT, Al-Inany HG, Aboulghar MM, Aboulghar MA, Serour GI. Among women undergoing embryo transfer, is the probability of pregnancy and live birth improved with ultrasound guidance over clinical touch alone? A systemic review and meta-analysis of prospective randomized trials. *Fertil Steril* 2007; 88:333-41.
153. Garcia Velasco J, Isaza V, Martinez-Salazar J, Landazabal A, Requena A, Remohi J, et al. Transabdominal ultrasound guided embryo transfer does not increase pregnancy rates in oocyte recipients. *Fertil Steril* 2002; 78:534-9.
154. Sallam HN, Sadek S. Ultrasound-guided embryo transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2003; 80:1042-6.
155. Kosmas IP, Janssens R, De Munch L, Al Turki A, Van Der Elst J, Tournaye H, et al. Ultrasound-guided embryo transfer does not offer any benefit in clinical outcome: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2007; 22:1327-34.
156. Matorras R, Uguijo E, Mendoza R, Corcostegui B, Exposito A, Rodriguez-Escudero FJ. Ultrasoundguided embryo transfer improves pregnancy rates and increases the frequency of easy transfers. *Hum Reprod* 2002; 17:1762-6.
157. Atal B and Urman B. Letters to the Editor. *Hum Reprod* 2008; 23:457-460.
158. Lewin A, Schenker JG, Avrech O, Shapira S, Safran A, Friedler S. The role of uterine straightening by passive bladder distension before embryo transfer in IVF cycles. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:32-4.
159. Lorusso F, Depalo R, Bettocchi S, Vacca M, Vimercati A, Selvaggi L. Outcome of in vitro fertilization after transabdominal ultrasound-assisted embryo transfer with a full or empty bladder. *Fertil Steril* 2005; 84:1046-8.
160. Sallam HN, Agameya AF, Rahman AF, Ezzeldin F, Sallam AN. Ultrasound measurement of the uterocervical angle before embryo transfer: a prospective controlled study. *Hum Reprod* 2002 17:1767-1772.
161. Papageorgiou TC, Hearn-Stokes RM, Leondires MP, Miller BT, Chakraborty P, Cruess D, et al. Training of providers in embryo transfer: what is the minimum number of transfers required for proficiency? *Hum Reprod* 2001; 16:1415-9.
162. Gergely R, DeUgarte CM, Danzer H, Surrey M, Hill D, DeCherney AH. Three dimensional/four dimensional ultrasound-guided embryo transfer using the maximal implantation potential point. *Fertil Steril* 2005; 84:500-3.
163. Baba K, Ishihara O, Hayashi N, Saitoh M, Taya J, Kinoshita K. Three-dimensional ultrasound in embryo transfer. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 16:372-3.
164. Behr BR. Transvaginal ultrasound-guided embryo transfer improves outcome in patients with previous failed in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2002; 77:769-75.
165. Goudas VT, Hammitt DG, Damarico MA, Session DR, Singh AP, Dumesic DA. Blood on the embryo transfer catheter is associated with decreased rates of embryo implantation and clinical pregnancy with the use of in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 70:878-82.
166. Nabi A, Awonuga A, Birch H, Barlow S, Stewart B. Multiple attempts at embryo transfer: does this affect in-vitro fertilization treatment outcome? *Hum Reprod* 1997; 12:1188-90.
167. Jones HW. Embryo transfer. In: Seppala M, Edwards RG, editors. *In vitro fertilization and embryo transfer*. New York: The New York Academy of Sciences; 1985. p. 375-80.
168. Schmidt CL. Techniques of embryo transfer. In: Wolf DP, Quigley MM, editors. *Human in vitro fertilization and embryo transfer*. New York: Plenum; 1984. p.327-40.
169. Waterstone J, Parsons J, Bolton V. Recumbent rest after embryo transfer. *Lancet* 1988; 2:1318-9.
170. Sharif K, Afnan M, Lenton W, Khalaf Y, Ebbiary N, Bilalis D, et al. Do patients need to remain in bed following embryo transfer? The Birmingham experience of 103 in-vitro fertilization cycles with no bed rest following embryo transfer. *Hum Reprod* 1995;10:1427-9.
171. Woolcott R, Stanger J. Ultrasound tracking of the movement of

- 
- embryoassociated air bubbles on standing after transfer. *Hum Reprod* 1998;13:2107-9.
- 172. Lambers MJ, Lambalk CB, Schats R, Hompes PG.** Ultrasonographic evidence that bedrest after embryo transfer is useless. *Gynecol Obstet Invest* 2009;68:122-6.
- 173. Su TJ, Chen YC, Hung YT, Yang YS.** Comparative study of daily activities of pregnant and non-pregnant women after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Formos Med Assoc* 2001; 100:262-8.
- 174. Bar-Hava I, Kerner R, Yoeli R, Ashkenazi J, Shalev Y, Orvieto R.** Immediate ambulation after embryo transfer: a prospective study. *Fertil Steril* 2005; 83:594-7.
- 175. Purcell KJ, Schembri M, Telles TL, Fujimoto VY, Cedars MI.** Bed rest after embryo transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2007;87:322-6.
- 176. Li B, Zhou H, Li W.** Bed rest after embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 Apr;155(2): 125-8. doi: 10.1016 / j. ejogrb. 2010.12.003.
- 177. Tremellen KP, Valbuena D, Landeras J, Ballesteros A, Martinez J, Mendoza S, et al.** The effect of intercourse on pregnancy rates during assisted human reproduction. *Hum Reprod* 2000; 15:2653-8.
- 178. Yaniv S, Jaffa AJ, Eytan O, Elad D.** Simulation of embryo transport in a closed uterine cavity model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 May;144 Suppl 1:S50-60. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.02.019. Epub 2009 Mar 17.
- 179. Küçük M.** Bed rest after embryo transfer: is it harmful? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012 Dec 26. pii: S0301-2115(12)00538-6. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.11.017.
- 180. Herrero G, Peinado I, de la Orden M, Pérez-Bermejo G, Monzó A, Romeu A.** Evaluación mediante un baremo de las dificultades y complicaciones de la transferencia embrionaria. *Rev Iberoam Fert.* 2005;22:163-70.