

Ventajas e inconvenientes de la transferencia embrionaria en +3 y en blastocisto

Advantages and disadvantages of embryo transfer in day 3 and blastocyst stage

María Rodríguez Agüera, Laura Prats Ruiz, Olga Cairó Doncos, Felipe Del Río Bueno, Arturo Brascosco Macazzaga, Mario Brascosco Macazzaga Mario

Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH, Clínica Corachán). Barcelona

RESUMEN

Objetivo: Entre los diversos factores con influencia en las tasas de implantación y gestación evolutiva, la calidad del embrión es uno de los factores pronósticos más importantes. Sin embargo, la elección del embrión con el mayor potencial de implantación para transferir sigue siendo uno de los puntos críticos dentro del laboratorio de fecundación in vitro (FIV). Hoy en día, a pesar de la existencia de múltiples sistemas de selección no invasivos, los parámetros morfológicos siguen siendo uno de los criterios más utilizados por los embriólogos.

Los avances en los medios de cultivo embrionario han permitido a los laboratorios de FIV el cultivo óptimo de embriones hasta el estadio de blastocisto. La razón principal para realizar una transferencia en esta etapa es mejorar la sincronía entre ambiente uterino y desarrollo embrionario y la selección de los embriones más viables.

El objetivo de este estudio es realizar una revisión bibliográfica con el fin de poder determinar en que situaciones la transferencia de blastocistos (día 5 y 6) mejora las tasas de implantación comparado con los embriones tempranos (día 2 y 3), y evaluar las posibles ventajas e inconvenientes en cada caso.

Material y métodos: Se han analizado 10 estudios randomizados que comparan la efectividad de la transferencia de blastocistos y embriones en estadios más precoces.

Conclusión: Existe una pequeña diferencia en la tasa de recién nacido vivo (RNV) y de implantación a favor del cultivo a blastocisto. Se ha observado que la transferencia en estadio de blastocisto podría incrementar las tasas de implantación en pacientes jóvenes con un mínimo de embriones de buena ca-

Aceptado 15/7/13

Correspondencia: Dra: María Rodríguez Agüera. Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH, Clínica Corachán). Plaza Eguilaz, 14. 08017 Barcelona

SOLICITUD REIMPRESIÓN: E- mail: contacto@editorialmedica.com

lidad en día 3, dando lugar a una mayor sincronía con el ambiente endometrial y coincidiendo con un menor grado de contracciones uterinas en el día de la transferencia. Este estadio permite hacer una selección embrionaria más precisa, ya que la activación del genoma embrionario se produce cuando los embriones están a 8 células aproximadamente. También se observa un menor número de embriones aneuploides, ya que la prolongación del cultivo permite incrementar la selección del embrión más viable.

Es necesario establecer cuidadosamente aquellos grupos de pacientes a los que la transferencia en blastocisto representaría una mejora en los resultados del ciclo, reduciendo al máximo las posibilidades de cancelación de ciclo y favoreciendo la transferencia electiva de un único embrión (SET: single embryo transfer), el único método realmente efectivo para evitar las gestaciones múltiples, una de las complicaciones más importantes de los tratamientos de FIV.

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

Palabras clave: *Transferencia embrionaria, día 3, blastocisto, transferencia electiva, gestación múltiple.*

SUMMARY

Among several factors that influence implantation rate and pregnancy outcome, embryo quality is one of the most important. However, the election of the embryo with the highest implantation potential is still a matter of debate at the vitro fertilization laboratory (IVF). Nowadays, despite the existence of multiple noninvasive selection systems, morphological parameters remain one of the main criteria used by embryologists.

Advances in embryo culture media have allowed IVF laboratories to successfully grow embryos to the blastocyst stage. The main reason to perform the embryo transfer at this stage is to improve the synchrony between the uterine environment and embryonic development and the selection of the most viable embryo.

The aim of this study was to review the literature in order to determine in which transfer at blastocyst stage (day 5 and 6) improves implantation rates compared to transfer at earlier stages (day 2 and 3), and to evaluate the potential advantages and disadvantages in each case.

Methods: We analyzed 10 randomized trials comparing the effectiveness of early cleavage versus blastocyst stage transfers.

Conclusion: There is a small difference in live birth rate (LBR) and implantation in favour of transfer at blastocyst stage. It has been observed that this could increase implantation rates in young patients with a minimal of three top quality embryos on day 3, resulting in greater synchrony with the endometrial environment and coinciding with a lower degree of uterine contractions on the day of transfer. Blastocyst stage allows more accurate embryo selection, because the activation of the embryonic genome occurs approximately at 8 cells stage. Moreover, due to the culture extension, fewer aneuploid embryos are observed.

It is necessary to establish carefully those groups of patients who will benefit from a blastocyst transfer, minimizing the chance of cycle cancellation and favouring elective transfer of a single embryo (SET: single embryo transfer), which is the most effective method to avoid multiple pregnancies.

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

Key words: *embryo transfer, day 3, blastocyst, single embryo transfer, multiple pregnancy.*

INTRODUCCIÓN

Desde el nacimiento de la Reproducción Asistida, el esfuerzo de todos los laboratorios se ha centrado en la obtención del embrión más viable para conseguir el nacimiento de un niño sano.

Para alcanzar este objetivo, se han ido desarrollando diferentes métodos y sistemas de cultivo que favorezcan el desarrollo correcto de los embriones, y que nos permitan una

selección más precisa de aquellos con la mayor capacidad de implantación.

Una correcta evaluación de la calidad embrionaria es determinante para el éxito de un programa de FIV. En la mayoría de clínicas de Reproducción Asistida, esta valoración se basa principalmente en criterios de evaluación morfológica de los embriones en división. Los embriólogos deben ser capaces de relacionar las características que van observando

con el potencial de implantación de cada uno de los embriones en sus distintos estadios de desarrollo. Estudios recientes basados en la captación de imágenes a tiempo real (“time lapse”) indican que no sólo son importantes los tiempo de división, sino también el tiempo entre cada una de las divisiones.

Tras llegar al estadio de 8 células, los blastómeros comienzan a mostrar adhesión entre ellos debido al aumento de las uniones intercelulares, concretamente de tight junctions. Es el inicio de la compactación. El quinto día de desarrollo, tras la compactación celular, empieza a formarse una cavidad denominada blastocele y se produce la diferenciación celular. Esta nueva morfología embrionaria recibe el nombre de blastocisto.

El primer modelo de clasificación fue propuesto de Gardner and Schoolcraft en 1999 y fue adoptado por muchos laboratorios (1). Este sistema se ha ido modificando, por ejemplo en el consenso de Estambul (AlphaScientist in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), y también se ha creado un sistema muy similar en ASEBIR (Asociación Española de Biología de la Reproducción). Los parámetros de clasificación se basan en el grado de expansión del blastocele, tamaño, forma y grado de compactación de la MCI y estructura y número de células del trofoectodermo. Los blastocistos con una gradación óptima para estos tres parámetros muestran las mejores tasas de implantación. El tiempo y el grado de expansión del blastocisto ha sido identificado como un importante predictor de la implantación.

La activación del genoma embrionario tiene lugar cuando el embrión tiene alrededor de 8 células. El nivel de transcripción es mínimo durante las primeras divisiones celulares, utilizándose el conjunto de proteínas y RNAm que ha almacenado el ovocito maduro. Un retraso del desarrollo embrionario puede relacionarse con una disminución de los niveles de RNAm, de manera que un correcto desarrollo hasta blastocisto se relaciona con una correcta transición materno-cigótica.

No todos los embriones son capaces de llegar a la fase de blastocisto. Está descrito que entre el 40 % y el 60 % de los ovocitos fecundados in vitro alcanzan este estadio, y esta capacidad está directamente relacionada con la morfología que presenta el embrión en estadios más tempranos. Se han sugerido ciertos factores clínicos relacionados con altas tasas de blastulación, como por ejemplo mujeres jóvenes, con paridad previa, utilizar la fecundación in vitro convencional y bajas dosis de gonadotrofinas en la estimulación (2). La mayoría de los embriones que tienen un desarrollo correcto alcanzan la fase de blastocisto el quinto día de desarrollo (112-120 horas post inseminación), pero algunos

muestran un desarrollo más lento, diferenciándose el sexto día (136-140 horas post inseminación). La tasa de implantación de estos embriones es inferior, pero no despreciable.

Se ha sugerido un posible efecto paterno en el desarrollo preimplantacional y en la formación del blastocisto. Pacientes con seminogramas normales tienen mayores tasas de formación de blastocisto que aquellos con parámetros alterados. El ensayo TUNEL en espermatozoides, que detecta roturas en el DNA, muestra la correlación negativa entre la fragmentación del DNA y el desarrollo hasta blastocisto (3). Algunos estudios observan una menor tasa de blastulación con ICSI, pero no queda claro si es debido al factor masculino asociado a la indicación de la técnica o a la técnica en sí misma.

Uno de los objetivos prioritarios en las técnicas de reproducción asistida es reducir la incidencia de embarazos múltiples y de alto orden (más de 2 sacos fetales), por las complicaciones que conllevan, sin afectar a las tasas de implantación y RNV. La tasa de gestación múltiple tras un tratamiento de fecundación in vitro en Europa es del 21,7 % comparado con el 1,1 % de la concepción natural (4). La transferencia electiva de un único embrión para un grupo de pacientes determinado ha pasado a ser una práctica habitual en varias clínicas de todo el mundo, dados los efectos adversos que conllevan las gestaciones múltiples, como el aumento de la morbilidad perinatal y la mortalidad, las complicaciones obstétricas y el elevado coste sanitario (5). La principal razón para transferir 2 o 3 embriones es la percepción de que aumentando el número de embriones se conseguirán mejores resultados. Esta creencia, compartida por pacientes y algunos clínicos, está respaldada por la literatura. Encontramos artículos que afirman que la transferencia de más de un embrión da lugar a una mayor tasa de implantación (6), pero ninguno de estos estudios reporta los resultados perinatales y las posibles complicaciones que tienen lugar. De modo que la importancia de seleccionar el embrión más viable para transferir ha intensificado los esfuerzos para mejorar las técnicas actuales de selección, y el cultivo a blastocisto puede ser uno de los posibles mecanismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Han sido incluidos para la revisión bibliográfica 10 estudios randomizados que comparaban la efectividad de la transferencia de embriones tempranos versus blastocistos.

Los artículos fueron identificados a través de la búsqueda en la base de datos MEDLINE, desde el año 2000 hasta la actualidad, así como directamente en revistas científicas (Human Reproduction, Fertility and Sterility, RBM Online), en los que se hablara de la comparación de la transferencia

en estadio de blastocisto con transferencias de embriones más precoces.

En la búsqueda se usaron las siguientes palabras clave: blastocyst transfer, embryo transfer, cleavage embryo transfer, clinical pregnancy, day 2/3 transfer, elective single embryo transfer.

Inicialmente, se revisó el título y el resumen de los artículos encontrados, para ver cuáles cumplían los criterios de inclusión. Se incluyeron aquellos artículos que compararan transferencias de embriones tempranos (día 2 y día 3 post-punción) con transferencias en blastocisto (día 5 y día 6). Se han incluido tanto estudios que seleccionaban pacientes con buen pronóstico (mínimo de cigotos correctamente fecundados, parejas jóvenes, mínimo de embriones con buena calidad) como aquellos sin selección concreta de pacientes. Las técnicas utilizadas son tanto la fecundación in vitro convencional como la microinyección, excluyendo aquellos estudios que utilizaran la maduración in vitro o el diagnóstico genético preimplantacional. Otro de los criterios de inclusión fue el medio de cultivo, siendo válido tanto el cultivo con medio único como el secuencial, y excluyendo aquellos que utilizaran el cocultivo. Se excluyeron los estudios que solo aportaban datos de las transferencias de embriones congelados. Los que en principio cumplían los requisitos, se analizaron exhaustivamente. Finalmente, se seleccionaron para la revisión bibliográfica aquellos estudios que fueran randomizados y que compararan aquellos parámetros importantes para este análisis (tasa de embarazo por transferencia, tasa de implantación, tasa de cancelación, tasa de aborto, tasa de congelación).

RESULTADOS

- Coskun et al. 2000: compara transferencias a día 3 y día 5. El criterio de inclusión es tener 4 o más cigotos correctamente fecundados. La tasa de embarazo por transferencia es del 39% en ambos días. La tasa de implantación es en día 3 del 21 % versus el 24 % en día 5. La tasa de cancelación es el 0 % en ambos grupos (7).
- Karaki et al. 2002: Compara transferencias a día 3 y a día 5. Los criterios de inclusión son tener 5 o más cigotos correctamente fecundados en día 1. La tasa de embarazo por transferencia es del 29 % en día 3 y del 35 % en día 5. La tasa de implantación es del 13 % en día 3 y del 26 % en día 5. La tasa de cancelación es del 0 % en día 3 y del 11 % en día 5 (8).
- Rienzi et al. 2002: Compara transferencias a día 3 y a día 5. Los criterios de inclusión son mujeres menores de 38 años con un mínimo de 8 cigotos correctamente fecundados en día 1. La tasa de embarazo por transferencia es del 56 % en día 3 y del 58 % en día 5. La tasa de implantación es 35 % en día 3 y del 38 % en día 5. La tasa de RNV por paciente es del 50 % en día 3 y del 48 % en día 5 (9).
- Van der Auwera et al. 2002: Compara transferencias a día 2 y a día 5. No establece criterios de selección. Hacen el seguimiento de hasta cinco ovocitos inseminados, ya que el resto son criopreservados. La tasa de embarazo por transferencia es del 35 % en día 2 y del 60 % en día 5. La tasa de implantación es del 27,4 % en día 2 y del 51,1 % en día 5. La tasa de RNV es del 27 % en día 2 y del 36 % en día 5. La tasa de cancelación es el 10 % y el 27 % respectivamente (10).
- Bungum et al. 2003: compara transferencias a día 3 con las de día 5. Los criterios de inclusión son tener 3 o más embriones en día 3 con un mínimo de 8 células y menos de un 20 % de fragmentación. Tasa de embarazo por transferencia: 63,2 % en día 3 y 52,5 % en día 5. La tasa de implantación es 43,9 % en día 2 y 36,7 % en día 5 (11).
- Emiliani et al. 2003: Compara transferencias a día 2 y a día 5. Los criterios de inclusión son mujeres de menos de 39 años, con 4 o más cigotos fecundados correctamente. Las tasas de embarazo por transferencia son del 44,1% en día 2 y del 37,1% en día 5. La tasa de implantación del 29 % en día 2 y del 30 % en día 5. La tasa de RNV del 44,1 % en día 2 y del 39,4 % en día 5. La tasa de cancelación es del 1,1 % en día 2 y del 10 % en día 5 (12).
- Kolibianakis et al. 2004: Compara transferencias a día 3 y a día 5. Los criterios de inclusión son mujeres con menos de 43 años (aunque las medias de edad son 31,3 en día 3 y 31,5 en día 5). La tasa de embarazo por transferencia es del 34,4 % en día 3 y del 39,5 % en día 5. La tasa de implantación del 24,5 % versus 26,6 %. La tasa de cancelación es del 6,8 % en día 3 y del 15,9 % en blastocisto (13).
- Papanikolaou et al. 2005: Compara transferencias a día 3 y a día 5. Los criterios de inclusión son mujeres menores de 38 años con un mínimo de 4 embriones de buena calidad en día 3. La tasa de embarazo por transferencia es del 32,1 % en día 3 y del 52 % en blastocisto. La tasa de implantación es del 20,6 % versus el 37,3 % en día 5. La tasa de RNV es del 27,4 % en día 3 y del 47,5 % en día 5. La tasa de cancelación es el 0 % en ambos grupos (14).
- Papanikolaou et al. 2006: Compara transferencias de embrión único en día 3 y día 5. Los criterios de inclusión son mujeres menores de 36 años con un máximo de 2 tratamientos previos de FIV y un mínimo de 3 embriones de buena calidad en día 3. La tasa de embarazo por transferencia es del 37,6 % en día 3 y del 48,7 % en día 5. La tasa de implantación es del 27,4 % en día 3 y del 38,7 % en día 5 y la de RNV por paciente es del 21,6 % en día 3

y del 33,1 % en día 5. La tasa de cancelación es del 5,3 % y del 8,6 % respectivamente en día 3 y día 5 (15).

- Elgindy et al. 2011: Compara transferencias a día 3 y a día 5. Los criterios de inclusión son mujeres menores de 35 años y un mínimo de 4 embriones de buena calidad en día 3. La tasa de embarazo clínico es del 41 % en día 3 y del 59 % en día 5. La tasa de RNV es el 35 % (día 3) versus 52 % (día 5) (16).

Resumen global de los resultados (tabla 1):

- *Tasa de blastulación:* la tasa de formación de blastocisto varía del 28 % al 55.2 %, poniendo en evidencia las diferencias en los medios y los protocolos de los distintos laboratorios.
- *Tasa de implantación:* el cultivo largo proporciona la oportunidad de seleccionar aquellos embriones que muestran una mayor capacidad de desarrollo y permite una mayor sincronía con el ambiente uterino que los embriones de día 2 y 3. De manera que la transferencia en blastocisto da lugar a una mayor tasa de implantación en varios estudios (número de sacos fetales observados entre el número de embriones transferidos), aunque otros no observan diferencias, especialmente aquellos más antiguos.
- Existe una pequeña diferencia en la tasa de embarazo por transferencia y de RNV (recién nacido vivo) a favor del cultivo a blastocisto, especialmente aquellos estudios más actuales. Aunque en varios de los estudios, la tasa de embarazo clínico no presenta diferencias entre los dos grupos.
- *Tasa de aborto:* Se debería esperar una menor tasa de aborto con la transferencia de embriones en día 5, mejor seleccionados y transferidos con una mayor sincronía uterina, pero los resultados de los estudios no evidencian diferencias en los resultados entre los dos grupos. A excepción de algún artículo, como por ejemplo el de Papanikolaou et al. de 2006, donde la tasa de aborto es significativamente inferior con la transferencia en blastocisto.
- *Tasa de cancelación:* es mayor en las transferencias de blastocistos debido a la no evolución de los embriones antes del día de transferencia. Los datos son variables entre los diferentes ensayos, ya que algunos centros optan por transferir aquellos embriones que hayan evolucionado mejor el día de la transferencia, mientras que otros más restrictivos optan por la cancelación de la transferencia.
- *Tasa de criopreservación:* la proporción de embriones criopreservados es mayor en embriones tempranos y la tasa de cancelación de transferencia es más elevada en blastocistos. Hay una disminución en el número de embriones disponibles para criopreservar en día 5 y 6.

DISCUSIÓN

La evaluación morfológica de los embriones es subjetiva y nos proporciona un reflejo limitado del estatus euploide de los embriones, e incluso la selección del embrión con la mejor calidad en día 2 o 3 no nos asegura que este sea normal cromosómicamente. Se ha demostrado que una notable proporción de embriones morfológicamente normales en día 3 son anormales cromosómicamente, contribuyendo en la pérdida de la implantación posterior. Aunque la transferencia en blastocisto no puede asegurar la ausencia de anomalías cromosómicas, se ha observado un descenso de estas del 59 % en embriones de día 3 al 35 % en blastocisto en mujeres mayores de 36 años. Aunque algunos embriones genéticamente anormales son capaces de alcanzar el estadio de blastocisto, el riesgo de presentar aneuploidías es menor en blastocistos que en embriones más tempranos (17). Además, los embriones hacen la transición del genoma materno al embrionario alrededor del estadio de 8 células. Cultivar los embriones hasta blastocisto, donde el genoma embrionario se ha activado completamente, nos permite hacer una selección más precisa que la basada únicamente en los criterios morfológicos de estadios anteriores.

Hay estudios que muestran un menor porcentaje de aborto con las transferencias en blastocisto, ya que el embrión escogido para transferir viene de una cohorte de día 3 que ha pasado por un proceso de selección hasta día 5, de manera que muestran una mayor capacidad de implantación y menos posibilidad de finalizar en aborto. La tasa de aborto en el primer trimestre en mujeres menores de 35 años con transferencia en día 3 sigue siendo elevada y la transferencia en blastocisto puede ser una de las opciones para optimizar el proceso de selección (18). La disminución en el porcentaje de abortos con transferencias a día 5 no solo está relacionada con una mejor selección, sino que también juega un rol importante la receptividad uterina. Las concentraciones hormonales suprafisiológicas que se producen durante la estimulación folicular en los tratamientos de FIV son responsables de un desarrollo endometrial alterado que se observa hasta la fase lútea (19). Parece ser que los embriones de día 3 se encuentran expuestos prematuramente, y esta asincronía puede dar lugar a una menor tasa de implantación o abortos tempranos. Experimentos animales muestran que la exposición de los embriones a factores de crecimiento uterinos en tiempos inadecuados dan lugar desde a fallos de implantación hasta a un aumento de la mortalidad fetal.

De igual modo, la transferencia en blastocisto presenta una mayor sincronización a nivel endometrial, ya que in vivo los embriones alcanzan la cavidad endometrial cuando comienza la compactación, siendo también distintas las nece-

TABLA 1

Resultados generales de los estudios analizados *

Media Embriones TE D2/3-D5/6	Tasa de blastulación*	Tasa implantación* D2/3-D5/6	Tasa emb/TE* D2/3-D5/6	Tasa de RNV* D2/3-D5/6	Tasa de aborto* D2/3-D5/6	Tasa cancelación* D2/3-D5/6	Tasa de congelación* D2/3-D5/6	
Bungum 2003	2.0 – 1.96	55,2	43.9 – 36.7	63.2 – 52.5	---	15 – 29.2	---	95 - 59
Coskun 2000	2.3 – 2.2	28	21 – 24	39 – 39	32.7 – 35	12.8 – 7.7	0 – 0	---
Elgindy 2011	2.8 – 1.96	---	---	41 -59	35 - 52	9.8 – 6.8	---	95 - 75
Emiliani 2003	2.1 – 1.9	48,3	29 – 30	44.1 – 37.1	44.1 – 33.3	8.5 – 15.4	1.1 – 1.0	73 – 54
Karaki 2002	3.5 – 2.0	33	13 – 26	29 – 35	---	12.5 -17.9	0 – 11	42 – 28
Kolbianakis 2004	1.9 – 1.8	50.7	24.5 – 26.6	34.4 – 39.5	---	21.9 – 20.2	6.8 – 15.9	61.5 – 50.4
Papanikolaou 2005	2.0 – 1.97	---	20.6 – 37.3	32.1 – 52	27.4 – 47.5	34.3 – 28.3	0 – 0	36.3 – 23.5
Papanikolaou 2006	1.0 – 1.0	---	27.4 – 38.7	37.6 – 48.7	21.6 – 32.0	35.6 – 23.3	5.3 – 8.6	---
Rienzi 2002	2.0 – 2.0	44.8	35 – 38	56 – 58	50 – 48	6.3 – 10	---	87.5 – 36
Van der Auwera 2002	1.86 – 1.87	44.7	29.2 – 45.5	42 – 60	24.5 – 36.6	4.5 – 7.2	10 – 27	56 – 39

Todos los resultados de las diferentes tasas se expresan en tanto por ciento (%)

sidades nutricionales en este estadio. La transferencia en una parte inapropiada del tracto reproductivo en relación al estadio de desarrollo embrionario puede dar lugar a un estrés metabólico que podría afectar negativamente a la viabilidad embrionaria. La implantación ocurre en un periodo de tiempo que va desde el día 5 hasta el 7 post-fecundación, conocido como “ventana de implantación”. Muchos estudios demuestran que también ocurre la implantación aunque existan 3 días de asincronía, pero el tiempo ideal sería con un día como máximo de asincronía entre el embrión y el endometrio. Está demostrada también que la contractibilidad uterina disminuye a medida que avanzan los días y que el endometrio 5 días post-punción parece ser el óptimo para la implantación embrionaria, con una ventana de implantación similar en tiempo a la concepción natural (20).

Papanikolaou et al, en su estudio de 2005, demuestra que en un grupo concreto de pacientes (mujeres menores de 38 años con más de 3 embriones de buena calidad en día 3) la transferencia de dos blastocistos da lugar a una mayor tasa de éxito (47,5 % RNV) que la transferencia de dos embriones en estadios más tempranos (27,4 % RNV). El principal inconveniente de este estudio es la tasa de gemelaridad observada.

El riesgo de embarazo múltiple en mujeres que usan sus propios ovocitos disminuye con la edad. Con transferencias de dos embriones en pacientes de menos de 35, de 35 a 37 y de 38 a 40 años, se obtienen tasas de embarazo gemelar del 40 %, 33 % y 28 % respectivamente. Son valores nada despreciables, teniendo en cuenta que los riesgos obstétricos se incrementan con la edad. Las receptoras de ovocitos son pacientes con un alto riesgo de embarazo múltiple, con tasas incluso superiores al 40 % (21).

Varios estudios, sobretodo europeos, han demostrado que las tasas de gestación no se ven afectadas cuando se reduce el número de embriones transferidos de dos a uno en día 2/3. Un estudio finlandés encuentra que las tasas de gestación en mujeres de 36 a 39 años que se transfieren un embrión y las que se transfieren dos son muy similares (33,1 % versus 29,9 %), pero la tasa de gestación múltiple se encuentra muy reducida en el segundo grupo (16,6 % versus 1,7 %). En Suecia, un estudio multicéntrico randomizado con pacientes menores de 36 años, encuentra también tasas de embarazo similares (42,9 % y 38,8 %) pero una reducción de la tasa de gestación múltiple (33,1 % versus 0,8 %) cuando compara aquellas que han tenido transferencia de dos embriones con transferencia de un embrión en fresco. Cuando hacemos referencia a la transferencia en blastocisto y estudiamos también la reducción del número de embriones transferidos de dos a uno, un estudio retrospectivo en pacientes de buen pronóstico (mujeres menores de 38 años

en su primer ciclo de FIV con embriones de buenas calidad) encuentra tasas de gestación similares, del 79 % y 76 %, comparando la transferencia de dos y de un blastocisto, pero una clara diferencia en la tasa de gemelaridad, del 62 % al 3 %. Existe otro estudio americano, donde se comparan los mismos parámetros pero en mujeres menores de 40 años, encontrando resultados parecidos en las tasas de gestación, pero con una reducción de la tasa de embarazo múltiple del 25 % al 2 % si se transfiere un solo blastocisto (22).

Papanikolaou et al, en su estudio de 2006, demuestra que en mujeres menores de 36 años, que están en su primer o segundo ciclo de tratamiento de fecundación in vitro, la transferencia de un único blastocisto incrementa las posibilidades de embarazo y nacimiento comparándolas con la transferencia de un único embrión en estadios anteriores, reduciendo al 0 % la tasa de gestación múltiple. Además, un estudio escandinavo demuestra que la tasa de RNV con la transferencia de un único blastocisto es similar a la obtenida con la transferencia de dos embriones en estadios más tempranos. De manera similar, un análisis de 50 819 pacientes en tratamiento de FIV en Estados Unidos en 2001, muestra que la transferencia de un blastocisto resulta en tasas de RNV que van del 31,6 al 39,5 % en mujeres entre 20 y 37 años. De manera que cuando se transfieren el mismo número de embriones en ambos grupos, se observa un mayor potencial de implantación en el cultivo hasta blastocisto. Si se incluye la salud perinatal en los resultados, el estudio australiano de Wang et al. de 2010 muestra que la transferencia de un solo blastocisto aumenta la posibilidad de obtener un niño sano. Estos resultados están respaldados por un reciente estudio que compara los resultados obstétricos y perinatales de los nacimientos únicos comparando transferencias embrionarias de día 2 a 4 con día 5 y 6, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos (23). Pero ninguno de estos estudios reporta los datos de las criotransferencias, de manera que se debería estudiar porcentaje de éxito de las tasas acumulativas, sumando las transferencias de embriones criopreservados, cuando se proponen transferencias de un único embrión, tanto para blastocistos como para embriones más tempranos.

Wang et al. tiene en cuenta en su estudio no sólo la tasa de gestación sino que introduce el concepto de bebé sano (parto de mínimo 37 semanas de gestación, con un peso del neonato mayor de 2500g y sin anomalías congénitas). Encuentra una mayor tasa de gestación transfiriendo en estadio de blastocisto (42,3 %) comparado con embriones de día 2 o 3 (32,4 %) y la tasa de bebé sano con transferencia en blastocisto es del 27,4 % y del 18 % en días anteriores. La posible explicación vuelve a ser que prolongando el cultivo tiene lugar una selección natural que permite reducir el número de embriones anormales (24).

La transferencia electiva de un único embrión (SET: single embryo transfer) y el cultivo largo hasta blastocisto están siendo cada vez más utilizados para reducir los embarazos múltiples, especialmente de alto orden, en los tratamientos de FIV. El riesgo de embarazo múltiple puede reducirse sin afectar significativamente a la tasa de RNV seleccionando cuidadosamente los criterios de inclusión de los pacientes para SET, transfiriendo embriones de buena calidad y teniendo un buen programa de criopreservación. Aunque muchas de las parejas en tratamiento son reacias a transferir un único embrión debido a la percepción de que este hecho disminuye las probabilidades de éxito y a que en la mayoría de los países son los pacientes los que asumen la mayor parte del coste del tratamiento de FIV (25).

Aun así, existe la tendencia a nivel mundial de la transferencia electiva de un embrión. El 20 % de las transferencias en Europa en 2005 fueron de un embrión. El porcentaje de transferencias de un solo embrión varían entre los estados miembros, siendo la más alta la de Suecia (69 %), seguida de Finlandia (50 %), Bélgica (48 %), Dinamarca (33 %) y Eslovenia (30 %). Las tasas más altas se encuentran en Australia y Nueva Zelanda (57 % en 2006) y las más bajas en USA, del 2,8 % (36).

La ASRM (*American Society for Reproductive Medicine*) recomienda la transferencia de un único embrión cuando se aplica de manera selectiva en relación a las características de los pacientes y a la calidad embrionaria. Sería adecuada en pacientes menores de 35 años, con más de un embrión de buena calidad para transferir, en su primer o segundo ciclo, con antecedentes de éxito en el ciclo previo y en receptoras de óvulos. La transferencia de embrión único sería más conveniente realizarla en estadio de blastocisto, ya que estos poseen una mayor capacidad de implantación, como muestran varios de los estudios citados (27).

Todos estos estudios hacen referencia a un grupo selecto de pacientes con buen pronóstico, que no son la mayoría de los pacientes que se someten a técnicas de reproducción in vitro. De hecho, a pesar de obtener muy buenos resultados con la transferencia de un único blastocisto, la tasa de gestación gemelar sigue siendo constante, del 21,7 % en Europa en 2004, poniendo de manifiesto que la mayoría de las transferencias siguen siendo de 2 embriones. Hay que tener en cuenta que se han reportado tasas de embarazo triple del 2 al 5 % con transferencias de dos embriones, tanto con blastocistos como con embriones más tempranos, de manera que hay que tener en cuenta también el riesgo de embarazos de alto orden. Existen algunos estudios que han investigado la aplicación de esta política de transferencia (SET) en pacientes con peor pronóstico. Mullin et al. observa en su estudio de 2010 que en mujeres mayores de 38 años con al

menos 3 embriones de buena calidad se obtiene un 66% de embarazo clínico con transferencia de un único blastocisto. Otro estudio evidencia que en mujeres menores de 36 años sin ningún embrión de buena calidad en día 2, la transferencia de un blastocisto y la transferencia de dos embriones en estadios precoces muestran resultados similares, de modo que alargando el cultivo para transferir en día 5/6 no se comprometería el éxito de ciclo y se reduciría el riesgo de embarazo múltiple. De hecho, algunos de los embriones que en día 2 no serían aptos para su criopreservación alcanzan el estadio de blastocisto, quedando patente que la morfología embrionaria sigue siendo un factor con predicción limitada (28).

Se han identificado varios predictores de éxito en la selección de pacientes para SET en blastocisto que afectan directamente a la obtención de un RNV sano, tales como la obesidad, el tabaquismo y la edad (29).

- La obesidad está relacionada con un aumento de la infertilidad en ciclos naturales, menores tasas de embarazo y un aumento de las complicaciones obstétricas. Las mujeres obesas son a menudo infértiles y con frecuencia anovuladoras, con desarrollos foliculares insuficientes, un menor número de ovocitos recuperados y necesidad de mayores dosis de gonadotrofinas. Usando el modelo de donación de óvulos, se ha observado una disminución progresiva de las tasas de implantación y embarazo clínico a medida que aumenta el índice de masa corporal (BMI: body mass index) de la receptora, sugiriendo que no solo los factores ovocitarios afectan, sino que probablemente los endometriales contribuyen también en los resultados observados en este grupo de pacientes.
- También quedan patentes los efectos perjudiciales del tabaquismo en los resultados de los tratamientos de FIV, mostrando tasas de embarazo inferiores en mujeres fumadoras. Estas mujeres alcanzan la menopausia antes, tienen un mayor riesgo de embarazo ectópico, una menor reserva ovárica y un menor número de ovocitos recuperados. Por otra parte, se relaciona también con complicaciones obstétricas, tales como partos prematuros, bajo peso del recién nacido, desprendimiento prematuro de la placenta así como con una mayor morbilidad peri y postnatal.
- Está ampliamente demostrado el efecto de la edad en el éxito de los tratamientos de FIV. Aunque el incremento de la edad se asocia con menores tasas de implantación y embarazo, la incidencia de gestación múltiple sigue siendo importante en mujeres con más de 35 años, y los riesgos obstétricos en este grupo de pacientes son mayores. Se ha visto que el riesgo de padecer preclamsia, desprendimiento de placenta y placenta previa se encuentra aumentado con la edad, y el parto prematuro es más probable en mujeres

con más de 40 años. Este hecho nos hace plantearnos la inclusión de mujeres mayores en los programas de transferencia de embrión único. Veleva et al, en un estudio de 2006, compara transferencias de embrión único con transferencias de dos embriones en mujeres de 36 a 39 años y observa que mientras que no hay diferencias en la tasa de embarazo por embrión transferido ni en la tasa de RNV, existe una mayor tasa de embarazo acumulativa (54,0 % versus 26,7 %) y una menor incidencia de embarazo múltiple (1,7 % versus 16,6 %) en pacientes con transferencia electiva de un solo embrión, siendo este grupo de pacientes susceptible para la inclusión en estos programas (30). Este mismo investigador ha estudiado el impacto económico que tiene la transferencia de dos embriones (con el consecuente riesgo de embarazo múltiple) respecto a la transferencia electiva de un embrión y sus correspondientes ciclos de criotransferencia, obteniendo que la transferencia de embrión único es más efectiva y barata, basándose en el coste del tratamiento en sí (FIV/ICSI), la medicación y los gastos hospitalarios derivados del parto.

Se ha comprobado que la transferencia de blastocistos expandidos en día 6 se relaciona con peores tasas de embarazo que la transferencia en día 5, sugiriendo una menor viabilidad de los embriones con un desarrollo más lento o una menor sincronía endometrial de estos embriones. Diversos estudios postulan que la criopreservación de blastocistos a día 6 y posterior transferencia con ciclo sustitutivo en día 5 mejora los resultados obtenidos, comparándolos con ciclos en fresco de transferencia en día 6. Otra opción para evitar transferencias en día 6 sería transferir el embrión más evolucionado a día 5, aunque no esté expandido.

Altos niveles de estradiol el día de la administración de HCG (gonadotropina coriónica humana) disminuyen la tasa de embarazo. Se postula un efecto negativo en la receptividad endometrial, mientras que la calidad ovocitaria, la tasa de fecundación, división y calidad embrionaria se mantienen normales en estas pacientes. Además, las tasas de implantación se normalizan al realizar ciclos con embriones criopreservados. Los niveles suprafisiológicos de hormonas esteroideas causan daños en la receptividad endometrial, y la transferencia de embriones a día 2 y 3 tiene la desventaja que embrión y endometrio interactúan con mayor antelación, pudiendo verse afectada su capacidad de implantación. La transferencia en blastocisto en casos donde se obtienen valores superiores a 3000pg/ml estradiol mejora las tasas de embarazo y RNV, deduciéndose una mejora en la receptividad endometrial entre los días 3 y 5 (en pacientes menores de 35 años con al menos cuatro embriones de buena calidad en día 3), para minimizar el riesgo de cancelación de ciclo). Valores superiores a 4200pg/ml de estradiol se

han identificado como el umbral a partir del cual disminuye drásticamente la tasa de embarazo. Aunque se recuperen un mayor número de ovocitos en estos casos y se obtengan embriones de buena calidad, las pacientes con niveles inferiores presentan mejores tasas de embarazo y RNV. Existe una relación entre los altos niveles de estradiol y la elevación de la progesterona el día de la administración de la HCG (luteneización prematura). Un elevado número de folículos y, en consecuencia, un exceso de proliferación de las células de la granulosa, puede dar lugar a un aumento en la producción de progesterona. Se han reportado datos que dan como valores de corte niveles superiores a 1,5ng/ml de progesterona, a partir de los que observamos una notable disminución de las tasas de embarazo en pacientes con transferencia a día 2 o 3. Esta disminución en las tasas de gestación no se observa en aquellas pacientes que se transfieren en estadio de blastocisto. Estos resultados sugieren que en el quinto día lúteo, el endometrio se ha recuperado del impacto de las concentraciones suprafisiológicas de hormonas esteroideas a las que se ha visto expuesto. De manera que en casos donde se obtenga una elevada concentración de estradiol, en combinación con la elevación prematura de la progesterona, la transferencia en blastocisto resultaría beneficiosa, compensando los efectos adversos sobre la receptividad endometrial (16).

Uno de los argumentos en contra del cultivo a blastocisto es la mayor incidencia de cancelación de transferencia debido a un bloqueo en el desarrollo embrionario y el menor número de embriones disponibles para criopreservar. Además, se desconoce si este bloqueo en el desarrollo de los embriones de día 3 hasta blastocisto *in vitro* también sucedería de haber sido transferidos en un estadio más temprano. Se ha demostrado que pacientes que no tienen embriones a 8 células en día 3 y que se han llevado hasta día 5 dan un 0% de tasa de embarazo en contraste con la transferencia en día 3, que da una tasa de embarazo clínico del 33,3 % (31). *In vitro*, el desarrollo embrionario es más lento que *in vivo*, y algunos embriones pueden detener su desarrollo. De hecho, solamente un 41,9 % de los embriones con 7-9 células en día 3 dan buenos blastocistos, siendo este porcentaje del 13,8 % y del 27,5 % cuando los embriones tienen menos de 7 células o más de 9 respectivamente. Embriones con más de un 15 % de fragmentación únicamente dan un 16,5 % de buenos blastocistos, y con menos de un 15 % obtenemos un 33,3 % (32). Por tanto, observamos que los factores más determinantes en la calidad embrionaria para día 2 y 3, tienen también una gran influencia si se prolonga el cultivo. Al no obtener embriones para transferir a día 5, desconocemos si este bloqueo es debido a factores intrínsecos del propio embrión o al efecto deletéreo del cultivo prolongado. A

pesar de esto, en pacientes que tienen buen pronóstico, como aquellas menores de 35 años o con un mínimo de 4 embriones de buena calidad disponibles a día 3, se han encontrado tasas de cancelación similares transfiriendo en día 3 y en día 5.

Dadas las tasas tan diversas de blastulación presentadas en diversos artículos, quedan patentes las diferencias entre los distintos laboratorios, a pesar de seguir los mismos protocolos y utilizar idénticos medios de cultivo. Es necesario establecer criterios estrictos para detectar aquellos grupos de pacientes que obtendrán un mayor beneficio transfiriendo en blastocisto, como el número de embriones a 8 células en día 3 (Elgindy et al. 2011), número de cigotos (Emiliani et al. 2003) o el score pronuclear (Scott et al. 2000) (33). El estudio de Papanikolaou et al. de 2005 demuestra que es posible disminuir a cero la tasa de cancelación y aumentar la de RNV únicamente transfiriendo en blastocisto si existen un mínimo de 4 embriones de buena calidad en día 3 en mujeres menores de 38 años. Aunque serían necesarios más estudios para determinar si la transferencia en blastocisto sería apropiada también en mujeres mayores o con fallo repetidos de implantación.

Otro de los argumentos negativos del cultivo a blastocisto incluye una mayor incidencia de gemelos monocigóticos y una alteración del sex ratio a favor de los varones (aumento del sex ratio) (34). Este desequilibrio a favor de los varones es debido a una mayor tasa de crecimiento y expansión de los embriones XY, alcanzando antes el estadio de blastocisto, aunque otros autores no han encontrado diferencias significativas en sus estudios.

La incidencia de gemelos monocigóticos en la población general es 1 de cada 330 aproximadamente, y los datos de ciclos de reproducción asistida están alrededor del 1 %. La gemelaridad está relacionada con abortos, anomalías congénitas, alteraciones del peso y con el síndrome de transfusión gemelo-gemelo. Existe un debate sobre los factores que contribuyen a este aumento, como la edad materna, la estimulación ovárica, la ICSI, la eclosión asistida o la transferencia en blastocisto. El cultivo largo se ha relacionado con un aumento en esta tasa, pero artículos más recientes sugieren que las mejoras en las técnicas de cultivo pueden reducir esta incidencia. Algunos investigadores defienden que no es el cultivo prolongado sino las condiciones de cultivo, como los elevados niveles de glucosa en el medio, los que favorecen la producción de más radicales libres que favorecen la partición del embrión. Un reciente estudio muestra que la tasa de gemelos monocigóticos en transferencias de un blastocisto comparado con transferencias de un embrión en estadios precoces no se incrementa (35).

Existen diferentes criterios en los laboratorios para implantar el cultivo a blastocisto, que hacen referencia sobre todo

al día en que se toma la decisión (por ejemplo, número de folículos, ovocitos fertilizados, embriones a 8 células en día 3...). Es necesario establecer minuciosamente aquellos grupos de pacientes a los que la transferencia en blastocisto representaría una mejora en los resultados del ciclo, reduciendo al máximo las posibilidades de cancelación de ciclo. Hasta el momento se ha comprobado que el cultivo largo no tiene efectos adversos en los resultados obstétricos y perinatales. De modo que en determinados grupos de pacientes, la transferencia en blastocisto podría mejorar la selección embrionaria, dando lugar a una mayor sincronía con el ambiente endometrial y coincidiendo con un menor grado de contracciones uterinas, contrarrestando así el posible efecto perjudicial del cultivo largo en el embrión. En el futuro, la caracterización de marcadores y perfiles metabólicos y proteómicos, mejorarán la selección del embrión más viable, permitiendo mejorar los resultados actuales. Pero actualmente, para mejorar las tasas de embarazo tras un tratamiento de FIV, es necesaria una profunda comprensión de los factores pronósticos que optimicen la selección de pacientes para las diferentes técnicas existentes.

Los embarazos múltiples son una seria complicación derivada de los tratamientos de FIV. Actualmente, el principal desafío es evitar las gestaciones gemelares sin disminuir las probabilidades de conseguir un embarazo a término. La transferencia electiva de un único embrión debería ser recomendada cuando las características de los pacientes y la calidad embrionaria lo permitan, siendo la educación a los pacientes mediante la información proporcionada vital para su aceptación. Una información poco clara por parte de los clínicos y profesionales implicados puede dar lugar a conceptos erróneos que infravaloren la eficacia de la transferencia de un único embrión, tanto en estadio de blastocisto como en aquellos más tempranos. Deben explicarse claramente los riesgos asociados a las gestaciones múltiples a los pacientes. Un eficaz programa de criopreservación es vital para la aplicación de la transferencia electiva, donde las tasas de gestación acumulativas apoyarán la decisión de transferir los embriones individualmente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocyst. En: Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond, Jansen R, Mortimer D (ed). UK, Parthenon Publishing London, 1999; 378-388.
2. Thomas MR, Sparks AE, Ryan GL, et al. Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer. *FertilSteril* 2010; 94:543-48.
3. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, et al. Extent of nuclear DNA damage in ejaculate spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *FertilSteril* 2004; 82:378-83.
4. Nyboe-Andersen A, Goossens V, Ferraretti AP, et al. The European IVF-Monitoring (EIM) Consortium for the European Society of

- Human Reproduction Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2008; 23:756-71.
5. **Kissin DM, Schieve LA, Reynolds MA.** Multiple-birth risk associated with IVF and extended embryo culture: USA, 2001. *Hum Reprod* 2005; 20:2215-23.
 6. **Pandian Z, Templeton A, Serour G, et al.** Number of embryos for transfer after IVF and ICSI: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2005; 20:2681-87.
 7. **Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, et al.** Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum Reprod* 2000; 15:1947-52.
 8. **Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, et al.** Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome. *FertilSteril* 2002; 77:114-18.
 9. **Rienzi I, Ubaldi F, Iacobelli M, et al.** Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2002; 17:1852-55.
 10. **Van der Auwera I, Debrock S, Spiessens C, et al.** A prospective randomized study: day 2 versus day 5 embryo transfer. *Hum Reprod* 2002; 17:1507-12.
 11. **Bungum M, Bungum L, Humaidan P, et al.** Day 3 versus day 5 embryo transfer: a prospective randomized study. *RBM Online* 2003; 7:98-104.
 12. **Emiliani S, Debaere A, Vannin A, et al.** Similar delivery rates in a selected group of patients, for day 2 and day 5 embryos both cultured in sequential medium: a randomized study. *Hum Reprod* 2003; 18:2145-50.
 13. **Kolibianakis EM, Zilopoulos K, Verpoest W, et al.** Should we advise patients undergoing in-vitro fertilization to start a cycle leading to a day 3 or day 5 transfer? *Hum Reprod* 2004; 19:2550-54.
 14. **Papanikolaou EG, D'haesleer E, Verheycn G, et al.** Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage transfer when at least four embryos are available on day 3 of culture. *Hum Reprod* 2005; 20:3198-203.
 15. **Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, et al.** In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus cleavage-stage embryos. *The New England Journal of Medicine* 2006; 354:1139-46.
 16. **Elgindy EA, Abou-Setta AM, Mostafa MI.** Blastocyst-stage versus cleavage-stage embryo transfer in women with high oestradiol concentrations: randomized controlled trial. *RBM Online* 2011; 23:789-98.
 17. **Staessen C, Platteau P, Van Assche E, et al.** Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004; 19:2849-58.
 18. **De Neobourg D, Gerris J, Mangelschots K, et al.** Single top quality embryo transfer as a model for prediction of early pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2004; 19:1476-79.
 19. **Papanikolaou EG, Bourgain C, Kolibianakis E, et al.** Steroid receptor expression in late follicular phase endometrium in GnRH antagonist IVF cycles is already altered, indicating initiation of early luteal transformation in the absence of secretory changes. *Hum Reprod* 2005; 20:1541-47.
 20. **Fanchin R, Ayoubi J, Righini C, et al.** Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Hum Reprod* 2001; 16:1115-19.
 21. **Stillman RJ, Richter KS, Banks NK, et al.** Elective single embryo transfer: a 6-year progressive implementation of 784 single blastocyst transfers and the influence of payment method on patient choice. *FertilSteril* 2009; 92:1895-906.
 22. **Mullin CM, Fino ME, Talebian S, et al.** Comparison of pregnancy outcomes in elective single blastocyst transfer versus double blastocyst transfer stratified by age. *FertilSteril* 2010; 93:1837-43.
 23. **Fernando D, Halliday JL, Breheny S, et al.** Outcomes of singleton births after blastocyst versus nonblastocyst transfer in assisted reproductive technology. *FertilSteril* 2012; 97:579-84.
 24. **Wang YA, Kovacs G, Sullivan EA.** Transfer of a selected single blastocyst optimizes the chance of a healthy term baby: a retrospective population based study in Australia 2004-2007. *Hum Reprod* 2010; 25:1996-2005.
 25. **Ryan GL, Zhang SH, Dokras A, et al.** The desire of infertile patients for multiple births. *FertilSteril* 2004; 81:500-04.
 26. **Maheshwari A, Griffiths S, Bhattacharya S, et al.** Global variations in the uptake of single embryo transfer. *Hum Reprod Update* 2011; 17:107-20.
 27. **Practice Committee of the SART, Practice Committee of the ASRM.** Elective single-embryo transfer. *FertilSteril* 2012; 97:835-42.
 28. **Guerif F, Frapsauce C, Chavez C, et al.** Treating women under 36 years old without top-quality embryos on day 2: a prospective study comparing double embryo transfer with single blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2011; 26:775-81.
 29. **Dessolle L, Fréour T, Ravel C, et al.** Predictive factors of healthy term birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2011; 26:1220-26.
 30. **Veleva Z, Vilska S, Hydén-Granskok C, et al.** Elective single embryo transfer in women aged 36-39 years. *Hum Reprod* 2006; 2098-102.
 31. **Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA, et al.** The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *FertilSteril* 2000; 73:558-64.
 32. **Alikani M, Calderón G, Tomkin G, et al.** Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. *Hum Reprod* 2000; 15:2634-43.
 33. **Scott L.** Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *RBM Online* 2003; 6:201-14.
 34. **Dean J, Chapman M, Sullivana E, et al.** The effect on human sex ratio at birth by assisted reproductive technology (ART) procedures – an assessment of babies born following single embryo transfers, Australia and New Zealand, 2002-2006. *BJOG* 2010; 117:1628-34.
 35. **Papanikolaou EG, Fatemi H, Venetis C, et al.** Monozygotic twinning is not increased after single blastocyst transfer compared with single cleavage-stage embryo transfer. *FertilSteril* 2010; 93:592-97.