

El número y la calidad de los embriones transferidos en día 2 afectan la tasa de embarazos gemelares y múltiples.

Incidence of both twins and multiple pregnancy rates when different number of embryos with different quality were transferred at day 2 Post-ICSI.

Molina I.^a, Cervera R.P.^b, Dieguez L.^a, Monzó A.^a, Romeu A.^a

^aUnidad de Reproducción Humana. Hospital Universitario La Fe, Valencia.

^bLaboratorio de Reproducción y Biotecnología Animal. Universidad Politécnica de Valencia.

Resumen

Introducción: *Los criterios de selección de la calidad embrionaria aplicados a día 2-3 post-inseminación, basados en el número, tamaño y fragmentación de las blastómeras, son por lo general, muy poco predictores de la capacidad posterior de desarrollo embrionario. Ello obliga a la transferencia de más de un embrión para conseguir tasas de gestación aceptables, con el consiguiente riesgo de embarazos múltiples.*

Objetivo: *Evaluar el efecto del número de embriones transferidos en día 2, en función de su calidad (características morfológicas), sobre la tasa de embarazos gemelares y múltiples.*

Ámbito: *Hospital Universitario de Referencia.*

Diseño: *Estudio retrospectivo de 782 ciclos de ICSI (enero de 2000 y mayo de 2003) en los que fueron transferidos un máximo de 4 embriones, de los que al menos 2 eran de grado 1-2. Se compararon las tasas de embarazo, implantación y abortos en función del número de embriones transferidos.*

Resultados: *La tasa de embarazo aumenta con el número de embriones transferidos (2: 29% vs 3: 37% y 4: 40%; $p < 0,05$). Ello unido a una menor tasa de abortos (2: 21% vs 3: 19% vs 4: 18%; $p > 0,05$), aconsejaría la transferencia del número de embriones más elevado que la legislación permita. Sin embargo, la tasa de embarazos gemelares (30%) y múltiples (11%) cuando se transfieren 3 embriones, aunque similar a la obtenida en muchas de las Unidades de Reproducción Asistida, resulta inaceptable.*

Conclusiones: *En día 2, el criterio de selección de calidad embrionaria aplicado sólo permite discriminar y desestimar los embriones degenerados o bloqueados. Así pues, se propone reducir el número de embriones transferidos sin penalizar la tasa de embarazo, desarrollando de nuevos criterios de selección de calidad embrionaria en día 2.*

Palabras clave: ICSI. Embarazo múltiple. Transferencia a día 2. Calidad embrionaria.

Correspondencia: Dr. I. Molina
Servicio de Ginecología (Reproducción Humana)
Hospital Universitario La Fe
Avda. Campanar, 21
46009 Valencia

Summary

Introduction: Selection criteria of embryo quality applied at day 2 post-ICSI based on blastomere number, size and fragmentation degree, are usually poor predictors of further embryo development potential.

Objective: The evaluation of the effect of the number of embryos transferred at day 2, based on their quality (morphological characteristics), on both twinning and multiple pregnancy rates.

Design: Retrospective study of 782 ICSI cycles (from January 2000 to May 2003) have been considered. A maximum of 4 embryos were transferred in each cycle, and at least 2 of those embryos transferred were of grades 1-2. Pregnancy, implantation and abortion rates were compared when different number of embryos were transferred.

Setting: Human Reproduction Service at "La Fe" University Hospital.

Results: Pregnancy rate was significantly lower when 2 embryos were transferred (2: 29% vs 3: 37% y 4: 40%; $p < 0.05$). Moreover, abortion rate was lower when more than two embryos were transferred, although these differences did not reach levels of significance (2: 21% vs 3: 19% vs 4: 18%; $p > 0.05$). These both facts would suggest to transfer the highest number of embryos as allowed by the legislation. However, when 3 embryos were transferred, both twinning (30%) and multiple (11%) pregnancy rates, although similar to that obtained by the majority of ART units, are unacceptable.

Conclusions: The selection criteria of embryo quality applied at day 2 post-ICSI, only allows to discriminate and discard those degenerated or blocked embryos. Therefore, the development of new selection criteria of embryo quality at day 2 post-ICSI could reduce the number of embryos transferred without penalize pregnancy rate.

Key words: ICSI. Multiple pregnancy. Day 2 embryo transfer. Embryo quality.

INTRODUCCIÓN

Hasta el momento actual, y en términos generales, los embriones humanos han sido cultivados en condiciones subóptimas (1-3), que suponen el que un elevado número de embriones potencialmente viables sean incapaces de superar la transición maternal-cigótica (bloqueo). Esto hace que la transferencia se realice de forma rutinaria en día 2 o, como máximo, en día 3.

El objetivo perseguido por las Unidades de Reproducción Asistida es tener elevadas tasas de embarazos y partos simples en detrimento de los múltiples. La transferencia de un número reducido de embriones permitiría reducir e, incluso, eliminar el riesgo de partos múltiples (4, 5), siempre que ello no supusiera una merma en las tasas de gestación a término. Para ello pueden proponerse dos alternativas, de un lado disponer de criterios fiables de selección de la calidad embrionaria en día 2-3 post-inseminación, y, de otro, permitir la auto-selección embrionaria prolongando el cultivo in vitro hasta el estadio de blastocisto. Por lo que se refiere a la primera alternativa, señalar que en día 2-3 post-inseminación los criterios de selección de la calidad embrionaria habitualmente son muy poco predictivos de la capacidad posterior de desarrollo (6). Además, las tasas de im-

plantación por embrión transferido oscilan entre el 10% y el 40%, lo que obliga a que se transfieran de forma habitual más de dos embriones para lograr así tasas aceptables de embarazo, aunque con el consiguiente riesgo de partos múltiples. En cuanto a la segunda opción, desafortunadamente, la inadecuación de los medios de cultivo utilizados hasta ahora en muchos casos ha supuesto que las tasas de cancelación sean incluso dos veces superiores cuando la transferencia se realiza a día 5 frente a día 2-3 (6-8), además de no obtener mejoría alguna en la tasa de embarazo global (6, 9, 10-13).

Así, en el presente trabajo se pretende evaluar, en las condiciones y con los protocolos actuales, el efecto del número de embriones transferidos en día 2 post-ICSI, en función de su calidad, sobre la tasa de embarazos gemelares y múltiples.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo (enero de 2000 y mayo de 2003) considerando aquellos casos de ICSI en los que la mujer presentaba una función reproductora normal o lesión tubárica no obstructiva ($n = 782$ ciclos), siendo la causa de esterilidad estrictamente masculina (recuento en fresco $< 20 \times 10^6$ esper-

matozoides/ml, motilidad < 15% A+B), con el fin de analizar la relación entre la calidad embrionaria y la implantación. Se excluyeron los casos en que se emplearon espermatozoides criopreservados obtenidos por biopsia testicular, aspiración epididimaria o semen eyaculado. De entre los casos que cumplían los requisitos anteriores, se seleccionaron aquellos en los que al menos 2 embriones presentaban 2-4 células y grado 1-2 en día 2 post-ICSI.

Protocolo de estimulación

La hiperestimulación ovárica controlada se realizó con la administración a partir del tercer día del ciclo de estimulación de 150-450 UI diarias de FSH humana recombinante (Gonal Laboratorios Serono Madrid y/o Puregon, Laboratorios Organon Madrid) tras la supresión hipofisaria con análogos de la GnRH (Procrin, Synarel, Decapeptyl 0.1 diario) iniciada el día 22 del ciclo previo o con antagonistas de la GnRH (Cetrorelix, Cetrotide®, Laboratorios Serono Madrid, o Ganirelix, Orgalutron®, Laboratorios Organon, Madrid, a dosis de 0.25mg diarios) a partir de la observación de folículos mayores de 14mm por ecografía. La dosis diaria de FSH recombinante se ajustó en función de la respuesta individual de cada paciente.

Cuando se detectaron al menos 3 folículos de diámetro superior a 18 mm por ecografía vaginal y los niveles séricos de estradiol (evaluados por RIA; Bio Merieux España SA Madrid) fueron acordes con la respuesta ovárica, se desencadenó la ovulación con la administración de 10.000 UI de HCG (Profasi y/o Ovitrelle, Laboratorios Serono Madrid). La punción folicular se realizó 36 horas después de la administración de HCG por aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía.

Preparación de las muestras de semen

Tras la licuefacción completa de las muestras de eyaculado durante 30-40 minutos a temperatura ambiente, se tomó una muestra y se evaluó el recuento y motilidad en fresco y capacitado, volumen, licuado, aglutinado, test inmunológico y la progresión.

El eyaculado se mezcló con medio de cultivo IVF (Medicult) a partes iguales (volumen 1:1) y se realizó swim-up convencional. Los tubos (2-4), se centrifugaron a 300-600g durante 5-10 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 0,2-0,4 ml de IVF y se incubó durante 1 hora a 37°C y 5% CO₂ en aire. Seguidamente se recuperó el sobrenadante en donde se encontraban los espermatozoides móviles, y se evaluó el recuento y la motilidad en ca-

pacitado. En los casos con recuento <0,5*10⁶ spz/ml y motilidad <1%++, los espermatozoides se concentraron por centrifugación del eyaculado con IVF a 1500-3000 g durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 50-100 ul de IVF, y se evaluó la presencia de al menos 1 spz móvil en cámara Makler.

Fecundación y cultivo embrionario

Los oocitos recuperados se lavaron en medio FM (Flushing medium; Medicult). Seguidamente, las células del cúmulo se eliminaron con 80 UI/ml de solución de hialuronidasa (máximo 1 minuto), seguido por pipeteado mecánico. La ICSI se realizó siguiendo el procedimiento estándar entre 2 y 4 horas post-recuperación. Tras la ICSI los oocitos microinyectados se incubaron en medio IVF a 37°C y 5% CO₂ en aire.

El diagnóstico de la fecundación se realizó entre las 16-20 horas post-ICSI, en base al número de pronúcleos y/o corpúsculos polares. La transferencia se realizó 48h post-ICSI. Inmediatamente antes de la transferencia los embriones se clasificaron siguiendo el criterio de Veeck (14), en base al número y tamaño de las blastómeras así como la presencia de fragmentos citoplasmáticos. Se transfirieron un máximo de 4 embriones en función de su cronología de desarrollo y calidad embrionaria.

El diagnóstico de embarazo se realizó por determinación de BHCG sérica a los 12 días de la transferencia y, en caso de ser positiva, se confirmó mediante ecografía transvaginal 2 semanas después.

Análisis estadístico

Se evaluó el efecto del número de embriones transferidos sobre la tasa de gestación (número de gestaciones/número de transferencias), de implantación (número de sacos a 7 semanas de gestación /número total de embriones transferidos) y de abortos (número de abortos/número de gestaciones).

Los resultados obtenidos se analizaron por análisis de varianza de una vía.

RESULTADOS

Con la técnica actualmente empleada en nuestra Unidad, la tasa de embarazo alcanzada es significativamente mayor cuando se transfieren 3 o 4 embriones frente a la transferencia de 2 embriones (tabla 1). A lo que habría que unir la menor tasa de abortos cuanto mayor es el número de embriones transferidos. En cualquier caso y con independencia del número de

embriones transferidos, los abortos obtenidos, tabla 1) reducen considerablemente el número de pacientes que prosiguen la gestación.

Cuando se transfirieron 3 y 4 embriones, la incidencia de embarazos múltiples fue relativamente baja (11 y 17%), mientras que la tasa de embarazos gemelares fue similar cualquiera que fuese el número de embriones transferidos (tabla 2).

DISCUSIÓN

La disponibilidad de criterios fiables que estimaran en día 2-3 la posterior capacidad de desarrollo embrionario y fetal de los embriones humanos, permitiría reducir el número de embriones transferidos y por tanto el riesgo de embarazos múltiples. En este sentido, se han propuesto criterios de selección morfológicos tanto de aplicación en estadio de cigoto (basados en la orientación de los dos pronúcleos, en la apariencia del citoplasma y en la cronobiología de la primera división (15, 16) como en día 2-3 (basados en el número de células y el grado de fragmentación

de las blastómeras (17, 18), que pudieran estar relacionados con la capacidad del embrión para alcanzar el estadio de blastocisto en cultivo in vitro prolongado. Desafortunadamente, el grado de fiabilidad de tales criterios es bajo (6), con lo que, a lo sumo, su aplicación tan sólo permite desestimar los embriones ya degenerados o bloqueados. Ello, obliga a transferir más de un embrión para obtener tasas de gestación aceptables, con el consiguiente incremento en el riesgo de embarazos gemelares y/o múltiples (19).

Aún cuando en nuestro centro se ajusta el número de embriones transferidos en día 2 según el criterio de selección morfológico aplicado (ver material y métodos), la tasa de gestación e implantación aumenta con el número de embriones transferidos. Ello pudiera deberse a que, a una probabilidad de desarrollo embrionario dada, la probabilidad de que al menos un embrión sobreviva y se desarrolle a término aumenta con el número de embriones transferidos. A este menor efecto probabilístico cabe añadir el que deriva de nuestros resultados (tanto mejor cuanto mayor es el número de embriones transferidos), que indican que

Tabla 1

Resultados de tasa de gestación, implantación y aborto, cuando se transfieren 2, 3 o 4 embriones en día 2

	Nº embriones transferidos en día 2			Total	Significación
	2	3	4		
Nº casos	210	431	141	782	-
Tasa gestación	61/210(29%) ^b	160/431(37%) ^a	157/141(40%) ^a	278/782 (35%)	P<0,05
Tasa abortos	13/61(21%)	31/160(19%)	10/57(18%)	54/278(19%)	NS
Nº sacos	76	242	117	408	-
Tasa implantación	76/420(18%)	242/1293(19%)	117/564(20%)	435/2277 (19%)	NS
Evaluadas sobre los casos de embarazo con control ecográfico del número de sacos.					

Tabla 2

Tasa de embarazos gemelares y múltiples en función del número de embriones transferidos

	Nº embriones transferidos en día 2			Total	Significación
	2	3	4		
Emb. Simple	46/61 (75%) ^a	95/160 (59%) ^b	33/57 (58%) ^b	174/278 (62%)	P<0,10
Emb. Gemelar	15/61 (25%)	48/160 (30%)	14/57(25%)	77/278 (28%)	NS
Emb. Múltiple	-	17/160 (11%)	10/57(17%)	27/217 (12%)	NS
Evaluadas sobre los casos de embarazo con control ecográfico del número de sacos.					

las diferencias en la calidad y capacidad de supervivencia embrionaria basadas en los criterios morfológicos aplicados, aunque presentes, son leves. De hecho, cuando predominan los embriones de grado 2, transferir un número mayor supone una mejora en las tasas de gestación frente a cuando se transfieren de grado 1 en número más reducido (ver tabla 1).

Con el criterio de selección morfológica aquí aplicado, la tasa de embarazos múltiples obtenida (11 y 17%), es similar a la obtenida por otros autores que transfieren el mismo número de embriones, tanto en día 2-3 (2-19%; 18, 20-22) como en día 5 (4-13%; 18, 21). Incluso cuando consideramos conjuntamente los embarazos gemelares y los múltiples, la tasa obtenida en nuestro caso para 3 y 4 embriones (41 y 42%) es similar o algo inferior a la obtenida cuando se transfiere el mismo número de embriones, tanto en transferencias en día 2-3 (24-70%; 6, 13, 18, 20, 21, 22, 23), como en día 5 (40-54%; 24, 25).

La mayor tasa de gestación obtenida cuando se transfieren 3 embriones (37%) unida a la menor tasa de aborto (19%) y a una tasa de dobles y múltiples similar a la obtenida con 4 embriones (41%) aconsejaría la transferencia de 3 embriones. Sin embargo, el riesgo no desdeñable de embarazos múltiples que se presenta cuando se transfieren tres o cuatro embriones (11-17%), aunque éstos sean de grado 2, con los consiguientes problemas clínicos que suponen tanto para las pacientes como para los nacidos (26), desaconseja la transferencia de más de dos embriones, pese a que ello suponga una reducción importante en la tasa de gestación. Resulta obvio que la mejora de tal parámetro con la transferencia de sólo 2 embriones exige bien del desarrollo y aplicación de criterios de selección en día 2 que sean realmente predictores de la capacidad de desarrollo posterior o bien prolongar el cultivo *in vitro* hasta blastocisto utilizando medios adecuados.

Dado que, como hemos podido comprobar, no existen por el momento criterios fiables capaces de predecir el potencial de desarrollo de los embriones en día 2-3 post-ICSI, se propone, como alternativa para reducir el número de embriones transferidos de forma que no resulte penalizada la tasa de gestación pero evite los embarazos múltiples, prolongar el cultivo preimplantatorio hasta el estadio de blastocisto (27, 28).

El cultivo *in vitro* penaliza el desarrollo no sólo de los embriones deficitarios (29-31), sino también de algunos de los que habrían sido capaces de proseguirlo *in vivo*. Incluso aquellos que alcancen el estadio de blastocisto pudieran ver penalizado su desarrollo posterior. Por supuesto, tales efectos negativos se presentarán en mayor o menor medida en función de la técnica y medio de cultivo empleados. En este sentido,

la utilización de los medios de cultivo secuenciales desarrollados recientemente (23, 32, 33) ha permitido que un 25-50% de oocitos fecundados alcancen el estadio de blastocisto, con una tasa de implantación por blastocisto transferido superior al 50% (12, 34-36). Esta elevada tasa de implantación, superior a la obtenida cuando se realiza la transferencia en día 2-3 post-ICSI (10%-38%; 12, 37), se explicaría, de un lado por la mayor sincronía entre el estadio de desarrollo embrionario y el ambiente uterino (7, 12, 38) y, de otro, por la mayor calidad y capacidad de desarrollo del embrión transferido. Así Booth y cols. (39) observaron que la mayoría de los embriones nuclearmente anómalos no son capaces de alcanzar el estadio de blastocisto.

Debe señalarse que, cómo cabía esperar, el cultivo prolongado hasta día 5 supone que la tasa de cancelación previa al día de la transferencia sea más elevada que la correspondiente a día 2-3 post-ICSI (días 2-3: 0%-13% vs día 5: 11%-43%; 6, 7, 18). Sin embargo, si se reanalizan tales datos de forma que se consideren conjuntamente los casos de cancelaciones y de no embarazos por cada ICSI realizada, la tasa conjunta de ambos parámetros es similar en día 5 y en día 2-3 (día 5: 71-79% vs día 2-3: 74-78%; 6, 7, 18, 40), y ello, además, pese a que en día 5 se transfieren menos embriones (día 2-3: 1,5-5,9 y día 5: 0,8-2,6; 6, 7, 13, 18, 19, 20, 21, 24, 41, 42). Ciertamente, cuando la probabilidad de fracaso del ciclo es elevada, la cancelación previa a la transferencia cuando ésta se hace a día 5 evita la sensación de frustración que habría supuesto en estas parejas el diagnóstico negativo de gestación si la transferencia se hubiera realizado en día 2-3. Además se evitaría el gasto clínico que la transferencia comporta.

Dadas las ventajas que reporta la transferencia a día 5, y dada la ausencia de criterios de selección fiables a día 2-3, es aconsejable pues, modificar la estrategia de transferencia actualmente aplicada en nuestra Unidad, o cuanto menos compatibilizar ambas. Para ello, una de las primeras modificaciones a introducir debiera ser el cambio del medio de cultivo utilizado hasta ahora por otro desarrollado para el cultivo hasta blastocisto. Finalmente señalar que la aplicación de la nueva Ley de Reproducción Asistida pudiera obligar de forma indirecta a ello, dada la limitación que previsiblemente imponga en el número de embriones a transferir.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Bavister BD.:** Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. Hum Reprod Update 1995; 1: 91-148.

2. **Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J.:** Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 1996; 65: 349-53.
3. **Gardner DK, Lane M.:** Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3: 367-82.
4. **Ravhon A, Hurwitz A.:** Transfer of single embryo as a method to reduce twins pregnancy rate in in-vitro fertilization treatment. *Harefuah* 2002; 141: 301-5.
5. **De Sutter P, Van der Elst J, Coetsier T, Dhont M.:** Single embryo transfer and multiple pregnancy rate reduction in IVF/ICSI: a 5-year appraisal. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 464-9.
6. **Lundqvist M, Rova K, Simberg N, Lundqvist O.:** Embryo transfer after 2 or 5 days of IVF culture: a retrospective comparison. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81: 126-32.
7. **Kovacic B, Vlajsavljevic V, Reljic M, Lovrec, VG.:** Clinical outcome of day 3 versus day 5 transfer in cycles with one or two developed embryos. *Fertil Steril* 2002; 77: 529-36.
8. **Van der Auwera I, Debrock S, Spiessens C, Afschrift H, Bakelants E, Meuleman C, Meeuwis L, D'Hooghe M.:** A prospective randomized study: day 2 versus day 5 embryo transfer. *Hum Reprod* 2002; 17: 1507-12.
9. **Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S.:** Day-5 versus day-3 embryo transfer: a controlled randomised trial. *Hum Reprod* 2000; 15: 1947-52.
10. **Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqi A, Serkine AM, Tesquier L.:** Blastocyst stage transfer: the real benefits compared with early embryo transfer. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 6: 24-33.
11. **Alves da Motta EL, Alegretti JR, Baracat EC, Olive D, Serafini PC.:** High implantation and pregnancy rates with transfer of human blastocysts developed in preimplantation stage one and blastocyst media. *Fertil Steril* 1998; 70: 659-63.
12. **Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB.:** Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 84-8.
13. **Frattarelli JL, Leondires MP, McKeeby JL, Miller BT, Segars JH.:** Blastocyst transfer decreases multiple pregnancy rates in in vitro fertilization cycles: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2003; 79: 228-30.
14. **Veek LL.:** Evaluación de ovocitos y preembriones en el laboratorio de FIV. En Remohi, J.; Pellicer, A.; Bonilla-Musoles, F.; (Eds): *Avances en reproducción asistida*. Madrid Ediciones Diaz de Santos S.A.; 1992. Páginas 117-16
15. **Scott LA, Smith S.:** The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998; 13: 1003-13.
16. **Edwards RG, Beard HK.:** Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocysts?. *Hum Reprod* 1999; 14: 1-4.
17. **Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA, Fox JH, Hornstein MD, Ginsburg ES.:** The number of eight cell-embryo is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril* 2000; 73: 558-64.
18. **Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, Lahloub TM, Ibrahim MH.:** Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2002; 77: 114-8.
19. **Marek D, Langley M, Gardner DK, Phil D, Confer N, Doody KM, Doody KJ.:** Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1999; 72: 1035-40.
20. **Laverge H, De Sutter P, Van der Elst J, Dhont M.:** A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF. *Hum Reprod* 2001; 16: 476-80.
21. **Levron J, Shulman A, Bider D, Seidman D, Levin T, Dor J.:** A prospective randomized study comparing day 3 with blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2002; 77: 1300-1.
22. **Gerris J, Neuboroug D, Mangeslchots K, Van Royen E, Vercruyssen M, Barudy-Vasquez J, Kenburg M, Ryckaert G.:** Elective single day 3 embryo transfer halves the twinning rate without decrease in the ongoing pregnancy rate on an IVF/ICSI programme. *Hum Reprod* 2002; 17: 2626-31.
23. **Gorrill MJ, Kaplan PF, Patton PE, Burry KA.:** Initial experience with extended culture and blastocyst transfer of cryopreserved embryos. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 1472-4.
24. **Fong CY, Bongso A, Ng SC, Kumar J, Trounson A, Ratnam S.:** Blastocyst transfer after enzymatic treatment of the zona pellucida: improving in vitro fertilization and understanding implantation. *Hum Reprod* 1998.
25. **Urman B, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Mumcu A, Isiklar A.:** Zona-intact versus zona-free blastocyst transfer: a prospect randomized study. 2002, .
26. **Romeu A, García-Gimeno T, Monzó A, Romeu M, Gilabert-Estellés J, Gil F, Herrero G.:** Evolución de las gestaciones cuádruples en un programa de reproducción asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2003; 20: 65-75.
27. **Bolton VN, Wren ME, Parsons JH.:** Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertil Steril* 1991; 55: 830-2.

28. **Schnorr JA, Jones HW.:** The impact of high order multiple pregnancies. In: Sero Symposia USA, International Symposium on ART and Human Blastocyst 2000; 2: 3.
29. **BenKhalifa M, Menezo Y, Janny L, Pouly JL, Qumsiyeh EM.:** Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 140-8.
30. **Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, Wood C.:** Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 70: 1022-9.
31. **Jones GM, Trounson AO.:** Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. *Hum Reprod* 1999; 14: 1405-8.
32. **Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB.:** Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 2000; 15: 9-23.
33. **Langley MT, Marek DM, Gardner DK, Doody KM, Doody KJ.:** Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments. *Hum Reprod* 2001; 16: 902-8.
34. **Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J.:** A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 3434-40.
35. **Trounson A.:** New developments in human embryology offer a new dimension to clinical reproductive medicine. In Kemper RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB. (eds). *Fertility and Reproductive Medicine*. Elsevier, Amsterdam 1998; 19-49.
36. **Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C.:** Evolution of culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998; 13: 169-77.
37. **Mortimer D, Henman M, Catt JW.:** Development of an improved IVF culture system. In 6th World Congress on Fertility and Sterility, IFFS, Vancouver. *Fertil Steril Program Suppl* 1998.
38. **Bongso A.:** Handbook on blastocyst culture. Singapore: Sydney Press Indusprint 1999; 16.
39. **Booth PJ, Viuff D, Tan S, Holm P, Greve T, Callesen H.:** Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. *Biol Reprod* 2003; 68: 922-8.
40. **Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters MH.:** Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. *Fertil Steril* 2000; 73: 117-22.
41. **Khorram O, Shapiro SS, Jones JM.:** Transfer of non-assisted hatched and hatching human blastocysts after in vitro fertilization. *Fertil. Steril* 2000; 74: 163-5.
42. **Milki AA, Hinckley MD, Behr B.:** Comparison of blastocyst transfer to day 3 transfer with assisted hatching in the older patient. *Fertil Steril* 2002; 78: 1244-7.