

Prevención del embarazo múltiple en fecundación in vitro en España

Prevention of multiple pregnancy after in vitro fertilization in Spain

Rosa Tur, B. Coroleu, M^aJ. Torelló, M. Boada, A.Veiga, PN. Barri.

Servicio de medicina de la reproducción. Departamento de obstetricia y ginecología.
Institut Universitari Dexeus

INTRODUCCIÓN

Los registros de población española ponen de manifiesto que entre 1.980 y 2.002 se ha producido un notable aumento de la tasa de partos múltiples, especialmente desde 1990. Según datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), en los últimos veinte años, la tasa de partos gemelares se ha duplicado (75 cada 10.000 partos en el año 1980; 168 en el 2002) y la tasa de partos triples se ha incrementado en siete veces (11 cada 100.000 partos en el año 1980; 76 cada 100.000 partos en el 2002). (Tabla 1). En base a los misma fuente de datos (INE) y para evidenciar el incremento de los embarazos múltiples, supuestamente debidos a las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), se ha calculado la incidencia de gemelares y múltiples en la década de los años 1970, cuando no había métodos de reproducción asistida y se ha comparado a la década de los 1990 donde están definitivamente implantadas las TRA. En los años setenta la relación de los embarazos múltiples era de un parto gemelar por cada 120 partos, mientras que en el caso de los triples o más era de uno por cada 11.967; sin embargo, en la década de los años noventa, tenemos un parto gemelar por cada 89 partos y en el caso de los partos triples o más es de uno por cada 2.776 partos. La diferencia es sustancial si se compara con la progresión teórica que hubieran tenido los partos múltiples si se hubieran mantenido las condiciones de la década de 1970. (Tabla 2).

Las causas hay que buscarlas en primer lugar en el incremento en la edad de la maternidad y en segundo lugar al desarrollo de la Técnicas de Reproducción Asistida:

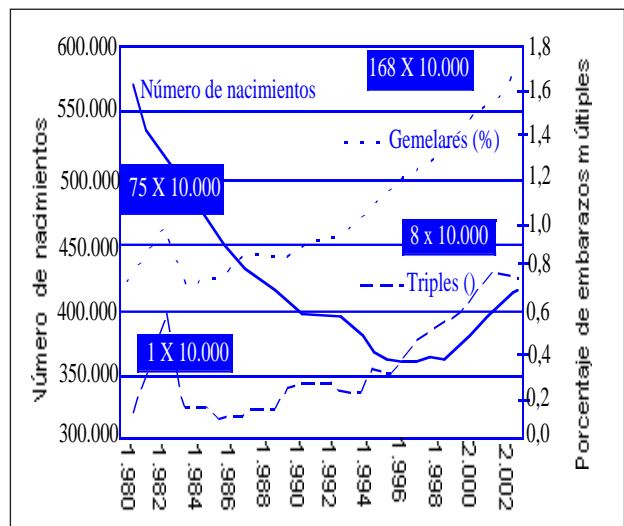


Tabla 1

Nacimientos y partos múltiples. España 1980-2002
Fuente: Instituto Nacional de Estadística. Gráfica R. Tur
(I:U: Dexeus)

- La fecundación in vitro en la que habitualmente se transfiere de más de un embrión.
- La inducción/estimulación de la ovulación (asociados o no a inseminación) en la que puede evolucionar más de un folículo

POLÍTICA DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Según datos aportados por la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) y registrados por la European Society for Human Reproduction and Embryology

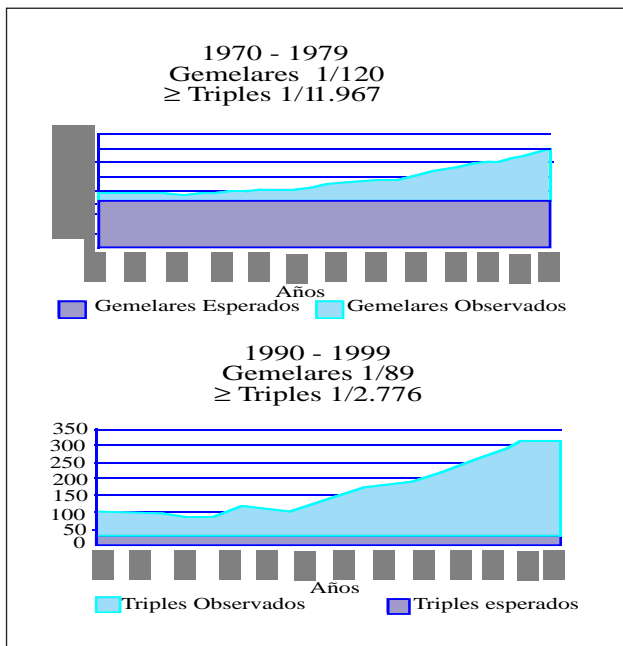


Tabla 2

*Incidencia partos gemelares/triples
Datos INE 1970-2002*

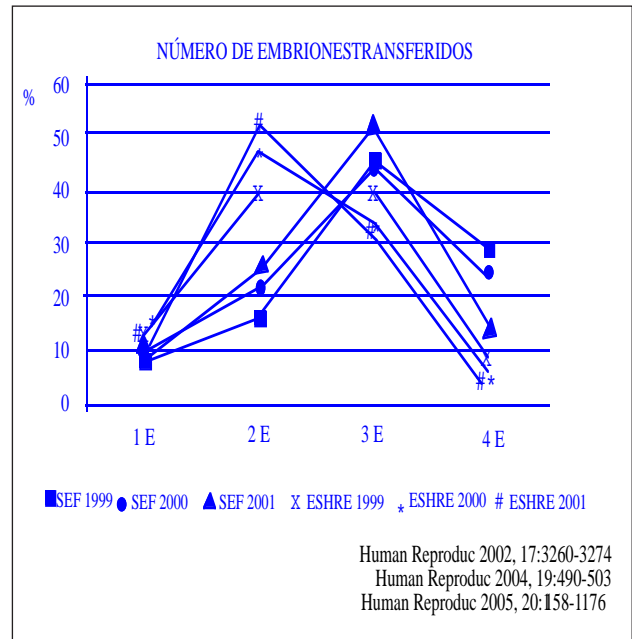


Tabla 3

*Registros FIV/ICSI
SEF -ESHE (1999-2000-2001)*

Human Reproduc 2002, 17:3260-3274
Human Reproduc 2004, 19:490-503
Human Reproduc 2005, 20:1158-1176

(ESHRE) de los ciclos FIV/ICSI realizados en los años 1999, 2000 y 2001 (1,2,3): prácticamente en el 50% de los ciclos se transfieren tres embriones en los tres años (45,6%;44,4%;51,2% respectivamente), aproximadamente en un 20% de los ciclos se transfieren dos embriones, con una clara tendencia al aumento a lo largo de los años (16,3%;22,1%; 24,8% respectivamente). La transferencia de cuatro embriones está por encima del 20% de los ciclos en los años 1999 y 2000 y hay una clara disminución en el año 2001 (29,4%;24,1%; 13,9% respectivamente). Solo se realizó la transferencia de un único embrión en un 10% de los ciclos (Tabla 3). Nuestras cifras contrastan notablemente con las cifras globales europeas, en las que en 1999 las tasas de transferencia de dos embriones fueron del 39,2% y en 2001 alcanzaron el 51,7%. En 2001 la tasa europea de transferencia de tres embriones se situaba en el 30,8% y solamente del 5,5% la transferencia de cuatro embriones. Finalmente en un 12% de los ciclos se transfirió un único embrión. En EEUU, según datos publicados por la American Society for Reproductive Medicine (ASRM) (4-6), los resultados son más similares a los nuestros, incluso con una mayor proporción de transferencias de cuatro o más embriones (año 1999: 36,3%, año 2000: 23,6% y año 2001:31,9%).

Si analizamos los datos europeos del 2001, publicados en el año 2005 (3) y los comparamos entre los países nórdicos (Finlandia, Suecia y Dinamarca), los países centroeuropeos (Francia, Inglaterra, Bélgica) y los países mediterráneos (España, Italia y Portugal) se observa que: en los países nórdicos hay una clara tendencia a la transferencia de uno y dos embriones, prácticamente no se transfieren tres o más embriones y en sus resultados los embarazos triples son casi inexistentes; en los países centroeuropeos en más del 50% de los casos transfieren dos embriones y en aproximadamente en un 20% de los ciclos transfieren tres embriones, sus tasas de embarazos triples se sitúan en aproximadamente el 1%; y finalmente en los países mediterráneos transferimos tres embriones en aproximadamente el 50% de los ciclos y con unas tasas de triples entre el 3-4% de los embarazos, tasas que superan de forma notable a la media europea (la media europea del registro del 2001 es del 1,5%).

En el caso de España, conviene señalar que los datos aportados a la ESHRE solo representan un pequeño porcentaje del total de ciclos realizados. Para el registro del año 2001 (3), aportaron los datos 47 centros de los 182 centros reconocidos, por lo que es probable que las cifras publicadas no estén del todo ajustadas a los datos reales, incluso las tasas de múltiples podrían ser superiores a las registradas.

NÚMERO DE EMBRIONES A TRANSFERIR: LEGISLACIÓN Y RECOMENDACIONES

Cada vez hay más países en los que legislan el número de embriones a transferir en un ciclo de FIV/IC-SI. Entre los que está legislado, el más restrictivo es Suecia que limita la transferencia a un embrión. En Inglaterra, Países Bajos y Dinamarca lo limitan a dos embriones (pudiéndose ampliar a tres en circunstancias especiales). La mayoría de los países han fijado el listón en tres embriones (España, Suiza, Italia, India), mientras que Hungría y Arabia Saudí incluyen excepciones para cuatro. El límite legal en el caso de Brasil es de cuatro.

Sin embargo, otros países simplemente emiten recomendaciones, que oscilan entre uno o dos hasta seis embriones. Así, Bélgica aconseja de uno a dos, Finlandia de uno a tres, Austria y Polonia dos, Estados Unidos de dos a cinco, Francia, Irlanda, Portugal y Japón tres, China y Venezuela de tres a cuatro, Hong Kong de tres a cinco, la República Checa cuatro y Canadá menos de seis (IFFS-Surveillance 2004) (Datos presentados por E. Ricciarelli, La Coruña 2004).

En España, la ley de 1988 condicionaba el número de embriones a transferir al criterio de cada clínico o cada centro. En el artículo cuatro de la ley 35/1988 se indicaba: "Se transferirán al útero solamente el número de preembriones considerado científicamente como el más adecuado para asegurar razonablemente el embarazo". Pero tras modificación legislativa de la ley 45/2003, no se pueden transferir más de tres embriones: "Solo se autorizará la transferencia de un máximo de tres preembriones en una mujer en cada ciclo".

Por otro lado, las sociedades científicas también establecen recomendaciones del número de embriones a transferir. En Inglaterra, el Royal College of Obstetricians and Gynaecology hace recomendaciones de índole general (informar a las parejas de los riesgos que comportan los embarazos múltiples, valorar los riesgos del embarazo múltiple y sus consecuencias etc.) y no aconseja transferir más de dos embriones en un primer ciclo de FIV (7).

La ASRM (8), hace recomendaciones más específicas en función de la edad. Son recomendaciones menos restrictivas que las europeas, especialmente a partir de los 38 años en que permiten hasta cuatro y cinco embriones en casos de peor pronóstico. En mujeres de menos de 35 años aconsejan la transferencia de un embrión en casos de buen pronóstico y recomiendan un máximo de dos embriones. Entre los 35 y

37 años, aconsejan transferir dos embriones si hay buen pronóstico y recomiendan un máximo de tres embriones. De los 38 a los 40 años, no más de tres embriones en caso de buen pronóstico y aconsejan un máximo de cuatro, y finalmente en mujeres de más de 40 el límite sería de cinco embriones. En Bélgica, han implementado una política de transferencia embrionaria en función de la edad de la mujer, del número de ciclo y de la calidad embrionaria. En mujeres menores de 35 años apuestan por la transferencia de un solo embrión en el primer y segundo ciclo siempre que dispongan de embriones de buena calidad y recomiendan no transferir más de dos sea el ciclo que sea. En mujeres entre 35 y 39 aconsejan transferir dos embriones en el primer y segundo ciclo, con un máximo de tres a partir del tercer ciclo. En mujeres de más de 40 años no habría límite en el número de embriones a transferir (9).

ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN DE LOS EMBARAZOS MÚLTIPLES

El embarazo múltiple es la complicación más frecuente tras la aplicación de técnicas de reproducción asistida (TRA) por lo que es necesario adoptar medidas para reducir su incidencia. La prevención de los embarazos múltiples radica en la limitación del número de embriones en la transferencia y el dilema se plantea en cómo hacerlo sin que repercuta de forma significativa en las tasas globales de embarazo.

A lo largo de los años se han establecido diferentes estrategias para la prevención de los embarazos múltiples:

1. Transferencia de dos o tres embriones

En 1991, Waterstone et al.(10) propusieron la transferencia embrionaria selectiva de dos embriones (TES-2). A partir de esta fecha, la mayoría de estudios (11-15) demuestran que en mujeres jóvenes y con embriones de buena calidad, con la TES-2 se consigue reducir la tasa de triples sin alterar las tasas globales de embarazo, de manera que en estos casos se impone la transferencia de dos embriones. Sin embargo, no siempre se dan estas óptimas condiciones, por lo que otros autores (16-19) sugieren la transferencia de más embriones en casos de mal pronóstico (edad avanzada, fallos repetidos de FIV, mala calidad embrionaria etc.). La cuestión se plantea si en estas circunstancias está justificada la transferencia de tres embriones, o en definitiva si la transferencia de más

embriones en casos de mal pronóstico aumenta las posibilidades de embarazo.

En el Institut Universitari Dexeus, con el objetivo de conocer si la transferencia de más embriones en casos de peor pronóstico aumenta las tasas de embarazo y su repercusión en la tasa de embarazos triples, se ha realizado un estudio retrospectivo en el que se han comparado la transferencia de dos frente a tres embriones. Se han analizado 2.388 ciclos de transferencia (1.508 ciclos de transferencia de dos embriones frente a 880 de tres embriones) realizados entre enero del 2001 y diciembre del 2004. Se transfirieron tres embriones en mujeres de peor pronóstico (más edad, mayor número de ciclos previos de FIV etc.). Las tasas de embarazo fueron similares transfiriendo dos (45,9%) que transfiriendo tres embriones (43,9%), con el agravante de que en éstos hubo un 7,5 de embarazos triples.

Al analizar por grupos de edad, las tasas de embarazo fueron similares entre la transferencia de dos y tres embriones, excepto en las mujeres de más de 40 años en las que la transferencia de tres embriones (26,6%) era estadísticamente superior a la transferencia de dos embriones (16,3%) ($p < 0.05$). El número de gestaciones triples se mantuvo en todas las franjas de edad, aunque de forma más evidente en mujeres menores de 33 años (entre un 10-15%).

Si en lugar de la edad, se toma como referencia el número de embriones óptimos en el momento de la transferencia, cuando se dispone de cómo mínimo un embrión de buena calidad, las tasas de embarazo fueron similares al transferir dos o tres embriones. Sin embargo, las tasas de embarazo fueron estadísticamente superiores al transferir tres embriones cuando no se disponía de ningún embrión de buena calidad (33,5% vs 22,9%) ($p < 0.05$). Por otro lado, el número de gestaciones triples se mantuvo en todas las circunstancias (4,6-11,6%), incluso en los casos de transferencia de tres embriones sin ningún embrión de óptima calidad (4,6%).

Al analizar las dos variables (edad y calidad de embrionaria) a igualdad de condiciones con el mismo número de embriones óptimos, en mujeres de menos de 38 años, no hay diferencias significativas en las tasas de embarazo cuando se compara la transferencia de dos a tres embriones. Lo que sí es importante es que al transferir tres embriones, aparecen las gestaciones triples cuya incidencia se sitúa entre el 6-10% de las gestaciones (Tabla 4). Cuando se analizan las mismas variables en mujeres de más de 38 años, las tasas de embarazo aumentan de forma significativa cuando se transfieren tres embriones en comparación a dos embriones, cuando no hay ningún embrión de

buen calidad (24,2% vs 4,1%) ($p < 0.001$), o cuando hay más de dos embriones de buena calidad (45,9% vs 31,5%) ($p < 0.05$), pero con un 12,8% de embarazo triples en este último caso.

Por todo ello y a la luz de estos resultados, en mujeres menores de 38 años no estaría justificada la transferencia de tres embriones en ninguna circunstancia, lo único que se conseguiría es incidir en la tasa de triples. En cambio, en mujeres de más de 38 años podría estar justificada la transferencia de tres embriones cuando se dispone de un o ningún embriones de óptima calidad (Tabla 5).

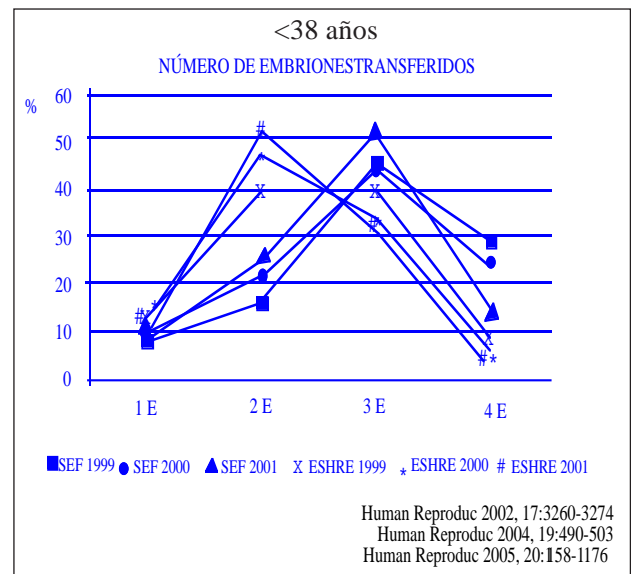


Tabla 4
TE-2 vs TE-3
IU Dexeus (2001-2004)

2. Transferencia de uno o dos embriones

En 1999, Vilska et al. (20) propusieron la transferencia embrionaria selectiva de un embrión (TES-1) en casos de buen pronóstico. Posteriormente, en la reunión de consenso de la ESHRE que tuvo lugar en Maastricht en Mayo del 2002 (21), en las conclusiones consideran que el embarazo gemelar es una complicación de las técnicas de reproducción asistida y plantean la TES-1 en casos de buen pronóstico (mujeres jóvenes, en su primer o segundo ciclo y con embriones de buena calidad). Recientemente se ha publicado una revisión de la TES-1 (22) en la que tras la valoración de los datos publicados de los estudios prospectivos randomizados, observan que las tasa globales de embarazo son superiores al transferir dos embriones (48%) al compararlo a la transferencia de

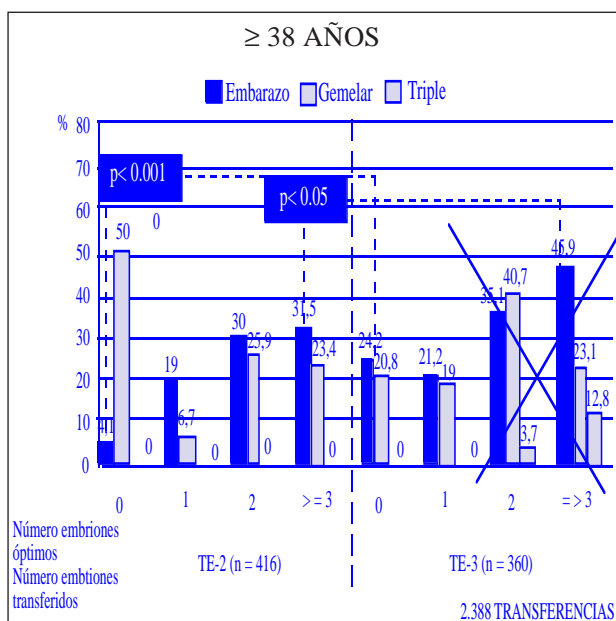


Tabla 5
TE-2 vs TE-3
IU Dexeus (2001-2004)

un embrión (32%), pero con una tasa de embarazo gemelar del 35% al transferir dos embriones. Sin embargo, para evaluar adecuadamente los resultados de la TES-1, habrá que valorar no solo las tasas de embarazo en fresco y las tasas de embarazo acumulativas post criotransferencia embrionaria, sino también el resultado final del proceso: “nacido vivo, niño sano”. Finalmente, concluyen que en los países que han incorporado en los últimos años la TES-1 de forma sistemática, no ha repercutido en sus tasas globales de embarazo (22-25).

En el Institut Universitari Dexeus, hace años iniciamos una política de reducción del embarazo múltiple. En el año 2002, entre las diversas estrategias planteadas, incorporó la TES-1 y se propone en mujeres <38 años siempre que dispongan de cómo mínimo dos embriones de buena calidad. Los resultados obtenidos desde octubre de 2002 a septiembre de 2004 son los siguientes: en 297 parejas se les propuso la TES-1, 191 (64,5%) aceptaron la TES-1 y en 105 (35,5%) solicitaron la transferencia embrionaria selectiva de dos embriones (TES-2). Los dos grupos fueron similares, excepto que las que solicitaron al TES-2 habían realizado más ciclos (1.6 ± 0.9) que las que decidieron la TES-1 (1.1 ± 0.4) ($p < 0.0001$). Las tasas de embarazo fueron significativamente superiores en la TES-2 (61%), al compararlas a la TES-1 (48%) ($p < 0.05$), con una tasa del 34.4% de gemelares

con la TES-2. Sin embargo, al analizar estos datos por grupos de edad, las tasas de embarazo no fueron significativas en mujeres de < 33 años (TES-1: 54,9% vs. TES-2: 64,8%) y si lo fueron en mujeres de más edad (TES-1: 38,5% vs. TES-2: 56,9%) ($p < 0.05$).

Por todo ello la TES-1 es una opción a considerar en mujeres jóvenes en sus primeros ciclos siempre que dispongan de embriones de buena calidad.

3. Transferencia en estadio de blastocisto

La transferencia en estadio de blastocisto permite seleccionar el embrión con mayor potencial de desarrollo y a su vez permite sincronizar la transferencia con el momento más idóneo para que se realice la implantación, ambos factores permitirán conseguir una mejor tasa de implantación. Éste podría ser un buen camino para reducir los embarazos múltiples. Diversos autores aconsejan limitar el número de blastocistos transferidos para no incrementar los embarazos múltiples e incluso lo proponen como opción para reducirlos (26-30).

El único estudio prospectivo randomizado (31) compara la transferencia de uno y dos embriones en estadio de blastocisto. Las tasas de implantación (56% y 60,9% respectivamente) y embarazo (76% y 60,9% respectivamente) son excelentes en ambos grupos y sin diferencias significativas, pero con una tasa del 47,4% al transferir dos embriones. Estos resultados son alentadores, sin embargo, por el momento son controvertidos debido a que tampoco se ha demostrado, en términos de eficacia, la superioridad de la transferencia en estadio de blastocisto respecto a la transferencia en estadio de células. Probablemente en el futuro, habrá que mejorar las técnicas de cultivo y de congelación/descongelación para que este modelo sea una posibilidad real.

PREVENCIÓN DEL EMBARAZO MÚLTIPLE. SEF

Uno de los grandes retos que se ha planteado la SEF es la reducción de la tasa de embarazos múltiples y por ello se creó en 2003 el Grupo de Interés “Salud Embrionaria”. Este grupo ha puesto en marcha diversos proyectos cuyo objetivo principal es la reducción de los embarazos múltiples, y el mayor reto es el de eliminar los embarazos triples o más, pero también, en la medida de lo posible, la disminución de la tasa de embarazos gemelares.

El punto de partida fue la elaboración de una en-

cuesta que se remitió a todos los centros de reproducción asistida y cuyos resultados se presentaron en el congreso de la SEF celebrado en La Coruña (I.Bruna, La Coruña 2004). Un total de 41 centros aportaron para su análisis 13.316 ciclos FIV/ICSI realizados en el año 2002. En el 47,4% de los ciclos se transfirieron tres embriones (6.325 ciclos), en el 32% se transfirieron dos (4.266), en el 10,2% (1.359 ciclos) se transfirió un solo embrión, en 9,7% (1.294) cuatro y en el 0,42% (56 ciclos) de los ciclos se transfirieron más de cuatro embriones. Si se comparan estos datos con los de los años 1999, 2000 y 2001 se observa discreta reducción de la transferencia de tres embriones a favor de dos embriones (Tres embriones: 2001= 51,2%, 2002= 47,4%. Dos embriones: 2001=13,9%, 2002=32%). Sin embargo, a pesar de que las tasa de embarazo fueron excelentes (38,89%), cabe destacar todavía una elevada tasa de embarazos múltiples (28,7% de gemelares, un 6,1% de triples y 0,32% cuádruples).

De las conclusiones de esta encuesta cabe señalar: Se transfieren un elevado número de embriones y solo un 1% de TES-1, las tasas de embarazo múltiple son elevadas (35%) especialmente de triples o más (6,4%). Entre los diferentes centros, se observaron unos criterios similares pero no universales en la evaluación de la calidad embrionaria y en el número de embriones a transferir y además, la mayoría no utilizan algoritmos en la decisión del número de embriones a transferir. El 90% de los centros aceptan la reducción embrionaria, pero la mitad las derivan hacia otros centros. El seguimiento obstétrico de los embarazos conseguidos tras la aplicación de las TRA lo realizan el 83 % de los centros.

A partir de estos datos, el Grupo de Interés "Salud Embrionaria" de la SEF se planteó una serie de objetivos:

- Elaboración de un folleto informativo para las pacientes.
- Recomendaciones del número de embriones a transferir.
- Unificar los criterios de embrión óptimo
- Proyecto de transferencia de transferencia selectiva de un embrión
- Realizar una encuesta de los ciclos de estimulación ovárica en procesos de inseminación.

Todos estos proyectos están en marcha y a disposición de todos los socios y/o centros de reproducción a través de la SEF y que con seguridad deberán ayudar a reducir las excesivas tasas de embarazo múltiple que tenemos en nuestro país.

NÚMERO DE EMBRIONES A TRANSFERIR: RECOMENDACIONES DE LA SEF

Las recomendaciones de consenso del número de embriones a transferir en FIV son las siguientes:

- En mujeres menores de 30 años transferir un máximo de dos embriones sin excepciones.
- Entre 30 y 37 transferir máximo dos embriones, a partir del tercer ciclo valorar la posibilidad de transferir tres embriones si no hay ninguno de buena calidad.
- En mayores de 37 años se aconseja la transferencia de dos embriones, pero valorar la transferencia de tres si no hay ningún embrión de buena calidad.
- Si se trata de donación de ovocitos, la recomendación es transferir uno o dos sin excepciones (Tabla 6).

Finalmente, la responsabilidad de la prevención del embarazo múltiple recae en diversos estamentos: Los profesionales deben conocer los riesgos de los embarazos múltiples, no sólo de los triples sino también de gemelares, riesgos que han de ser transmitidos a las parejas con una información objetiva y previa al inicio del ciclo de FIV. Las sociedades científicas tienen que dar a conocer el problema, aportar los medios necesarios para que se rectifique si es necesario y dar las recomendaciones oportunas. Los medios de comunicación tienen el papel de dar una información sensata y objetiva de los riesgos de los embarazos múltiples. La industria farmacéutica debería colaborar en la reducción de los costes del ciclo FIV y disminuyendo el coste de las gonadotropi-

Número de embriones a transferir		
Menores de 30 años	1 ó 2	Sin excepciones
entre 30-37 años	1 ó 2	Desde el tercer ciclo valorar la transferencia de 3 si no hay ningún embrión "de buena calidad"
Mayores de 37 años	2	Desde el primer ciclo valorar la transferencia de 3 si no hay ningún embrión de "buena calidad"
Donación de ovocitos	1 ó 2	Sin excepción

Tabla 6

Número de embriones a transferir

nas. La administración tendría una doble responsabilidad, por un lado, poner en marcha mecanismos que obliguen a los centros reconocidos a registrar sus datos a la SEF y por otro lado, también debería valorar la posibilidad de invertir más en sufragar los costes de los ciclos de FIV, este hecho podría reducir la presión de transferir más embriones para conseguir el embarazo, con ello se podría conseguir una reducción de la incidencia de partos múltiples, que, finalmente podría incidir en un menor coste para la sanidad pública.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ESHRE.:** Assisted reproductive technology in Europe, 1999. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 2002, 17:3260-4.
2. **ESHRE.:** Assisted reproductive technology in Europe, 2000. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 2004, 19:490-3.
3. **ESHRE.:** Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 2005, 20:1158-6.
4. **ASRM/SART Registry. Assisted reproductive technology in the United States.:** 1999 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 2002; 78:918-1.
5. **ASRM/SART Registry. Assisted reproductive technology in the United States.:** 2000 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 2004; 81:1207-0.
6. **ASRM/SART Registry. Assisted reproductive technology in the United States.:** 2001 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. Disponible en:URL: <http://www.cdc.gov/reproductivehealth/ART01/index.htm>
7. **Fertility assessment for people with fertility problems.:** Clinical Guideline. February 2004, pag 67-68. Disponible en URL: <http://www.rcog.org.uk>
8. **Practice Committee, Society for Assisted Reproductive Technology and the American Society for Reproductive Medicine.:** Guidelines on the number of embryos transferred. *Fertil Steril* 2004; 82:773-4.
9. **Ombelet W, De Sutter P, Van der Elst J, Martens G.:** Multiple gestation and infertility treatment: registration, reflection and reaction—the Belgian project. *Hum Reprod Update* 2005; 11:3-4.
10. **Waterstone J, Parsons J, Bolton V.:** Elective transfer of two embryos. *Lancet* 1991; 337:975-6.
11. **Staessen C, Janssenswillen C, Van Den Abbeel E, Devroey P and Van Steirteghem A.:** Avoidance of triplet pregnancies by elective transfer of two good quality embryos. *Hum Reprod* 1993; 8:1650-3.
12. **Nijs M, Geerts L, van Roosendaal E, Segal-Bertin G, Vanderzwalm P, Schoysman R.:** Prevention of multiple pregnancies in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1993; 59:1245-0.
13. **Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, Fukuda J, Tanaka T.:** Two instead of three embryo transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10:2155-8.
14. **Templeton, A. and Morris, J. K.:** Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization, *N Engl J Med* 1998; 339:573-7.
15. **Dean NL, Phillips SJ, Buckett WM, Biljan MM and Tan SL.:** Impact of reducing the number of embryos transferred from three to two in women under the age of 35 who produced three or more high-quality embryos. *Fertil Steril* 2000; 74: 820-3.
16. **Qasim SM, Karacan M, Corsan GH, Shelden R, Kemmann E.:** High-order oocyte transfer in gamete intrafallopian transfer patients 40 or more years of age. *Fertil Steril* 1995; 64:107-0.
17. **Svendsen TO, Jones D, Butler L, Muasher SJ.:** The incidence of multiple gestations after in vitro fertilization is dependent on the number of embryos transferred and maternal age. *Fertil Steril* 1996; 65:561-5.
18. **Geva E, Amit A, Lerner-Geva L, Lessing JB.:** Embryo transfer and multiple gestation. How many transfers are too many? *Hum Reprod* 1998; 13:2988-9.
19. **Salha O, Dada T, Levett S, Allgar V, Sharma V.:** The influence of supernumerary embryos on the clinical outcome of IVF cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2000;17:335-3.
20. **Vilksa S, Tiitinen A, Hyden-Granskog C, Hovatta O.:** Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Hum Reprod* 1999; 14:2392-5.
21. **Land JA, Evers JL.:** Risks and complications in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting. *Hum Reprod* 2003; 18:455-7.
22. **Bergh CH.:** Single embryo transfer: a mini review. *Human Reprod* 2005;20:323-7.
23. **De Neubourg D, Gerris J.:** Single embryo transfer - state of the art. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:615-2.
24. **Tiitinen A, Gissler M.:** Effect of in vitro fertilization practices on multiple pregnancy rates in Finland. *Fertil Steril* 2004; 82:1689-0.
25. **Debrock S, Spiessens C, Meuleman C, Segal L, De Loecker P, Meeuwis L, D'Hooghe TM.:** New Belgian legislation regarding the limitation of transferable embryos in in vitro fertilization cycles does not significantly influence the pregnancy rate but reduces the multiple pregnancy rate in a threefold way in the Leuven University Fertility Center. *Fertil Steril* 2005; 83:1572-4.

26. **Vidaeff AC, Racowsky C, Rayburn WF.** Blastocyst transfer in human in vitro fertilization. A solution to the multiple pregnancy epidemic. *J Reprod Med* 2000; 45:529-9.
27. **Toledo AA, Wright G, Jones AE, Smith SS, Johnson-Ward J, Brockman WW, Ng F, Wininger JD.** Blastocyst transfer: a useful tool for reduction of high-order multiple gestations in a human assisted reproduction program. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:377-9.
28. **Schoolcraft WB, Gardner DK.** Blastocyst versus day 2 or 3 transfer. *Semin Reprod Med* 2001;19:259-8.
29. **Garcia-Velasco JA, Simon C.** Blastocyst transfer: does it really affect the outcome? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001;13:299-4.
30. **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.
31. **Gardner D, Phil D, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft.** Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2004; 81:551-5.