



Universidad de Granada

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO PROSPECTIVO ALEATORIZADO DE LA
TRANSFERENCIA EMBRIONARIA ÚNICA ELECTIVA EN
FRESCO MÁS CRIOTRANSFERENCIA DE EMBRIÓN
ÚNICO vs. TRANSFERENCIA DE DOS EMBRIONES EN
FRESCO**

María Luisa López Regalado

GRANADA, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Luisa López Regalado
D.L.: GR 2206-2014
ISBN: 978-84-9083-290-5

D. FERNANDO RODRÍGUEZ SERRANO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. María Luisa López Regalado ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: **“ESTUDIO PROSPECTIVO ALEATORIZADO DE LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA ÚNICA ELECTIVA EN FRESCO MÁS CRIOTRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO vs. TRANSFERENCIA DE DOS EMBRIONES EN FRESCO”** que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 26 de Septiembre de 2014

Fdo: Fernando Rodríguez Serrano

D. ANA CLAVERO GILABERT, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTATIVA ESPECIALISTA DE ÁREA DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE LABORATORIO CLÍNICO Y UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “VIRGEN DE LAS NIEVES” DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. María Luisa López Regalado ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: **“ESTUDIO PROSPECTIVO ALEATORIZADO DE LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA ÚNICA ELECTIVA EN FRESCO MÁS CRIOTRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO vs. TRANSFERENCIA DE DOS EMBRIONES EN FRESCO”** que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 26 de Septiembre de 2014

Fdo: Ana Clavero Gilabert

D. JOSÉ ANTONIO CASTILLA ALCALÁ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, DIRECTOR CIENTÍFICO DEL CENTRO DE REPRODUCCIÓN “MASVIDA” DE SEVILLA.

CERTIFICA:

Que Dña. María Luisa López Regalado ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: **“ESTUDIO PROSPECTIVO ALEATORIZADO DE LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA ÚNICA ELECTIVA EN FRESCO MÁS CRIOTRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO vs. TRANSFERENCIA EN FRESCO DE DOS EMBRIONES EN FRESCO”** que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 26 de Septiembre de 2014

Fdo: José Antonio Castilla Alcalá

La doctoranda, M^aLuisa López Regalado y los directores de la tesis, D. Fernando Rodríguez Serrano, D^{ña} Ana Clavero Gilabert y D. José Antonio Castilla Alcalá, Garantizamos, que al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 26 de Septiembre de 2014

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo: D. Fernando Rodríguez Serrano

Fdo: D^{ña} Ana Clavero Gilabert

Fdo: D. José Antonio Castilla Alcalá

Agradecimientos:

Mis padres siempre me decían que si me rodeaba de personas mejores que yo siempre me iría bien, por lo que quiero expresar mi gratitud a todos quienes, de una u otra manera, me han acompañado en esta larga jornada.

Fundamentalmente agradecer al Dr. José Antonio Castilla, sus comentarios, apreciaciones, orientación y rigurosidad. Pero no solamente le agradezco este período de tesis, sino por lo que antecede y trasciende a este período. Muchas gracias por enseñarme que las segundas oportunidades se pueden aprovechar más que la primera.

A D. Ana Clavero, su apoyo y confianza en mi trabajo hizo que esta tesis resultara ser mil veces mejor que lo que se proyectaba originalmente, su capacidad para guiar nuestras ideas ha sido un aporte incalculable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como Embriólogo clínico.

A D. Fernando Rodríguez, por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis, destacando, por encima de todo, su disponibilidad, paciencia y buen humor, no cabe duda que su colaboración ha enriquecido el trabajo realizado.

A D. M^a Carmen Gonzalvo, porque me ha enseñado con empeño, su rigor metodológico, su forma de hacer las cosas y calidad humana. Gracias a su implicación en mi trayectoria.

A todos mis compañeros del laboratorio: Silvia, Inma, Blanca, Ali, Marina, Consu, Vane y Mario. Quienes siempre han estado a mi lado haciendo de esta tarea algo realmente formativo, interesante y, por supuesto, enriquecedor.

A Matías, por haberme facilitado siempre los medios suficientes, por todo su tiempo desinteresado a mi favor. Mil gracias.

A María, no sólo por ser mi compañera de tesis, sino porque este largo viaje ha significado el surgimiento de una sólida amistad. Porque nunca te he escuchado un no por respuesta, a veces haces más ruido a veces menos, pero estás, siempre se puede contar contigo. Suerte en tu nueva etapa.

A mi amiga del alma, Sandra, que siempre ha estado ahí en los buenos y malos momentos. Por hacer lo difícil, fácil; lo duro, divertido. Por todos los planes futuros, espero que podamos cumplir por lo menos la mitad.

Gracias a mi familia "postiza": Victoria, Miguel, Vito y Kevin, por ayudarme y hacerme el camino siempre más fácil.

A mis amigos: Loli, Eva, Esther, Meri, Kiki, Hari, Carolina y Jesús, porque a pesar de la distancia, siempre estáis en el momento adecuado.

A mis hermanas, M^a Carmen y Mercedes por superar las dificultades juntas y a pesar de todo seguir ilusionándonos con el futuro.

A Laura, Víctor, Pili y los pequeños Leo y Pol, mi familia granadina. Gracias por hacerme parte de vuestra increíble aventura.

También quiero agradecer el apoyo constante de mis padres porque nunca han dejado de animarme a continuar con mi formación, y cuya constancia y tenacidad en las tareas propuestas espero haber heredado.

Finalmente debo un especial agradecimiento, a todo el personal de la Unidad de Reproducción del H. U. Virgen de las Nieves de Granada por su entusiasmo y ayuda durante todas las fases de este estudio, por contribuir con su apoyo y enseñanzas a que este proyecto haya llegado a buen puerto. También agradecer a todas las parejas por su participación. Gracias a todas ellas podremos seguir haciendo buena medicina reproductiva.

A mis sobrinos

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes **revistas** científicas:

- López-Regalado ML, Clavero A, Gonzalvo MC, Serrano M, Martínez L, Mozas J, Rodríguez-Serrano F, Fontes J, Castilla JA. • Randomised clinical trial comparing elective single-embryo transfer followed by single-embryo cryotransfer versus double embryo transfer. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2014, 178:192-198
- López-Regalado ML, Clavero A, Gonzalvo MC, Serrano M, Martínez L, Mozas J, Rodríguez-Serrano F, Fontes J, Romero B, Castilla JA Cumulative live birth rate after two single frozen embryo transfer (eSFET) versus a double frozen embryo transfer (DFET) with cleavage stage embryos: a retrospective cohort. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. (Aceptado 9 de Septiembre 2014).

Y han sido presentados en las siguientes **reuniones** científicas nacionales:

- VIII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico (Sevilla, España). Septiembre 2014.
- XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) (Barcelona, España). Mayo 2014.
- VII Congreso Asociación Española para el estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR) (Sevilla, España). Noviembre 2013.

e internacionales:

- 29th edition of the Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (Munich, Alemania). Julio 2014.

Glosario

ACE: análisis coste-efectividad

ASEBIR: Asociación para el estudio de la Biología y la Reproducción

ASRM: Sociedad Americana de medicina reproductiva

cSET: transferencia obligada de embrión único

DC-DA: bicorales-biamnióticos

DET: transferencia de dos embriones

DFET: criotransferencia de dos embriones

DZT: dizigóticos

E2: estradiol

eSET: transferencia electiva de embrión único

eSFET: criotransferencia de embrión único

FET: transferencia de embriones congelados

FIV/ICSI: Fecundación in Vitro/Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

FSH: hormona folículo estimulante

GnRH.: hormona liberadora de gonadotropinas

HSC: histeroscopia

HSG: histerosalpingografía

IA: inseminación artificial

IAC: inseminación artificial conyugal

IAD: inseminación artificial de donante

ICER: relación del coste-efectividad incremental

IMC: Índice de masa corporal

LH: hormona luteinizante

LPC: laparoscopia

MZT: monocigóticos

NICE: Instituto Nacional de Salud y Excelencia clínica de Reino Unido

OMS: Organización Mundial de la Salud

RCT: ensayo clínico prospectivo aleatorizado

SART: Sociedad Americana de técnicas de Reproducción asistida

SET: transferencia de embrión único

SHO: síndrome de hiperestimulación ovárica

TE: transferencia embrionaria

TRA: técnicas de reproducción asistida

UCIN: unidad de cuidados intensivos neonatales

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Diagnóstico y tratamiento de la pareja estéril.....	3
1.1 Estudio básico de esterilidad.....	3
1.1.1 Anamnesis de la mujer.....	4
1.1.2 Exploración ginecológica.....	6
1.1.3 Evaluación tubárica	6
1.1.4 Esterilidad por factor masculino.....	8
1.1.5 Anamnesis del varón.....	9
1.1.6 Análisis de semen.....	10
1.2 Causas de esterilidad.....	11
1.3 Tratamiento de la esterilidad	13
2. Reproducción Asistida.....	13
2.1 Técnicas de Reproducción Asistida	13
2.1.1 Inseminación Artificial.....	13
2.1.2 FIV/ICSI.....	14
2.1.3 Otras técnicas	15
2.2 Evaluación ovocitaria	17
2.3 Evaluación del cigoto	19
2.4 Evaluación embrionaria: Morfología estática.....	21
2.5 Evaluación embrionaria: Métodos dinámicos	28
3. Efectos adversos de las técnicas de Reproducción Asistida.....	33
3.1 Gestación múltiple.....	33
3.2 Implicaciones en la salud de los embarazos gemelares.....	36
3.3 Implicaciones económicas de los partos múltiples	38
4. Estrategias para disminuir el embarazo múltiple en FIV	40
4.1 Programas nacionales para la reducción de la incidencia de las gestaciones múltiples	41
4.2 Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad	50
4.3 Financiación de la Reproducción Asistida y gestación múltiple.	
Contexto Internacional y español	53

5. Transferencia electiva de embrión único eSET	54
5.1 Eficacia de eSET versus DET	55
5.1.1 Estudios prospectivos aleatorizados.....	55
5.1.2 Estudios no aleatorizados retrospectivos y prospectivos.....	58
5.1.3 Experiencias clínicas	60
5.1.4 Coste-efectividad de la estrategia eSET vs DET	62
5.2 Indicación para la eSET.....	65
5.2.1 Estadio y calidad embrionaria.....	65
5.2.2 Edad de la paciente (ovocitos propios).....	66
5.2.3 Donación de ovocitos	66
5.2.4 Criotransferencia	67
5.3 Implantación de la eSET.....	67
5.3.1 Educación en el profesional.....	68
5.3.2 Educación del paciente.....	68
5.3.3 Mejora en la selección embrionaria	69
5.3.4 Mejora en la criopreservación embrionaria.....	70
5.3.4.1 Vitricación y eSET.....	70
5.3.4.2 Receptividad endometrial en criote.....	71
5.3.5 Cobertura sanitaria y eSET	72
OBJETIVOS	77
MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
1. Pacientes.....	81
1.1 Población de referencia	81
1.2 Población de estudio	81
1.3 Evaluación clínica de los pacientes	81
1.4 Selección de pacientes.....	81
1.4.1 Criterios de inclusión	81
1.4.2 Criterios de exclusión	82
2. Diseño del estudio	83

3. Métodos.....	84
3.1 Técnicas empleadas	84
3.1.1 Protocolos de estimulación.....	84
3.1.2 Etapas en el laboratorio de FIV/ICSI	85
3.1.3 Calidad embrionaria y ovocitaria	86
3.1.4 Vitrificación	87
4. Análisis de datos y métodos estadísticos.....	89
4.1 Recogida de datos y fuentes de información.....	89
4.2 Variables a analizar	90
4.3 Método estadístico	91
RESULTADOS.....	95
1. Descripción de la muestra.....	97
2. Características sociodemográficas.....	99
3. Resultados de estimulación ovárica e ICSI en las parejas eSET y DET .	102
4. Resultados de gestación en las parejas eSET y DET	106
4.1 Resultados de gestación en las parejas eSET y DET según protocolo.	106
4.2 Resultados de gestación en las parejas eSET y DET según intención de tratar.....	108
4.3 Resultado de las parejas excluidas	111
5. Resultados de la técnica de vitrificación embrionaria en eSET	113
6. Resultados obstetricos y neonatales de las parejas eSET y DET.....	115
6.1 Resultados obstetricos y neonatales de las parejas eSET y DET según protocolo.....	115
6.2 Resultados obstetricos y neonatales de las parejas eSET y DET según intención a tratar	117
6.3 Complicaciones que requieren ingreso en las parejas eSET y DET.	119
DISCUSIÓN	121

1. Tamaño de la muestra, criterios de inclusión y diseño del estudio.....	124
2. Participación de las parejas en el estudio.....	125
3. Resultados de Reproducción Asistida de las parejas eSET y DET	126
4. Resultados de la vitrificación embrionaria	130
5. Resultados de las parejas excluidas pre y post aleatorización.....	132
6. Resultados de las complicaciones que requieren ingreso.....	133
7. Limitaciones del estudio	133
8. Implantación de la eSET en el sistema sanitario público.....	135
CONCLUSIONES.....	141
BIBLIOGRAFÍA.....	145
ANEXOS	183

INTRODUCCIÓN

1. Diagnóstico y tratamiento de la pareja estéril

Las tasas de esterilidad según distintos estudios epidemiológicos se sitúan entre un 14-16% de las parejas en edad reproductiva. El 60% de las parejas en edad fértil consiguen quedar gestantes en 6 meses, el 85% en 12 meses y un 90% en 18 meses (Matorras and Hernández, 2007). La fecundidad mensual máxima de una pareja joven, con una mujer menor de 30 años, no es superior al 30% (Edwards, 1995; Ellis et al., 1996).

Se considera que una pareja padece esterilidad si tras 12 meses de relaciones sexuales sin métodos anticonceptivos no queda gestante. Sin embargo, la presencia de distintos factores distintos factores (más de 35 años en la mujer, anomalías menstruales, historia de enfermedad pélvica o testicular, endometriosis y cirugías a estos niveles) nos indicarían el inicio del estudio básico de esterilidad a los 6 meses de relaciones sexuales sin métodos anticonceptivos y no obtención de embarazo (WHO, 2010).

Existe controversia respecto a los términos que se emplean en la literatura para referirse a la esterilidad, infertilidad y subfertilidad. Según algunos autores, infertilidad debe reservarse para aquellas parejas que consiguen quedar embarazadas espontáneamente pero no consiguen un embarazo a término, ya que abortan. El término subfértil lo utilizan algunos autores para referirse a aquellas que no logran gestación tras 12 meses de relaciones, pero que con tratamientos específicos pueden conseguirlo. Por último, el término estéril se refiere a causas definitivas de esterilidad tales como ausencia de útero o de espermatozoides (Remohi y cols., 2004). En la mayoría de la literatura en castellano se igualan los términos de subfertilidad y esterilidad.

1.1 Estudio básico de esterilidad

La esterilidad es una enfermedad de la pareja y, como tal, hay que estudiar a ambos miembros en paralelo (Figura 1). Este estudio básico engloba:

- Anamnesis en ambos miembros de la pareja.
- Exploración ginecológica.

- Evaluación tubárica.
- Seminograma.

La evaluación inicial de la esterilidad masculina es simple, y por ello la realización de un seminograma debería preceder cualquier valoración invasiva en la mujer.

1.1.1 Anamnesis de la mujer

En la anamnesis de la mujer deberían cuestionarse y determinarse los aspectos y parámetros que se citan seguidamente.

- Historia médica:
 - Identificar otras patologías no ginecológicas pero con repercusión reproductiva.
 - Identificar el consumo de medicamentos, así como de tabaco, alcohol y otras drogas.
 - Determinar el índice de masa corporal y posible sobrepeso para aconsejar programas de adelgazamiento, incluso en pacientes normoovuladoras.
 - Medir la presión arterial y realizar analítica general con serologías para investigar inmunización frente a rubeola, aconsejando vacunación en caso de ser negativa. En la actualidad se debate sobre la conveniencia de investigar la inmunidad frente a toxoplasma durante el embarazo, pero una determinación pregestacional positiva nos permitirá considerar inmunizada a la futura gestante (González, 2001). También debe investigarse el estado serológico frente a Lúes, VHB, VHC y VIH.

- Historia familiar:

Ha de incluir el número de hermanos, los antecedentes de enfermedades de padres y hermanos, especialmente esterilidad y anomalías hereditarias, y la consanguinidad de los padres.

- Historia reproductiva:

- Duración de la esterilidad con la pareja actual y fertilidad previa.
- Enfermedades de la infancia e historia del desarrollo somático y puberal.
- Antecedentes quirúrgicos, historia sexual y genitourinaria, incluyendo enfermedades de transmisión sexual y exposición a gonadotoxinas.
- Antecedentes de patología ovárica.
- Frecuencia coital y posibles disfunciones sexuales.

La ovulación es un requisito imprescindible para la concepción, y por ello debe investigarse siempre. Los desórdenes ovulatorios suponen, aproximadamente, hasta un 15-25% de las causas de esterilidad (Mosher and Pratt, 1991). Una historia de ciclos menstruales regulares (24-35 días) se correspondería con una correcta ovulación en un 97% de los casos (Magyar et al., 1979).

Las determinaciones rutinarias de FSH, LH, TSH, prolactina y andrógenos tienen interés en mujeres con desórdenes ovulatorios con objeto de orientar la localización de la patología (prolactina y TSH en patología hipofisaria; FSH y LH para identificar hipogonadismos hipo o hipergonadotropos, así como criterios diagnósticos de SOP; 17-OH progesterona en hiperplasia suprarrenal; SDHEA y testosterona en hirsutismo) (González et al., 2007).

En mujeres de más de 35 años deberá investigarse el concepto de reserva ovárica y realizar un asesoramiento al respecto (Bukulmez y Arici, 2004). Para estudiar la reserva ovárica se pueden utilizar determinaciones ecográficas (recuentos foliculares antrales,...), determinaciones hormonales basales (FSH en día 3) o tests dinámicos como el de clomifeno o el de EFFORT.

En caso de esterilidad secundaria ha de registrarse el tiempo requerido para lograr cada una de las gestaciones previas. Si hay abortos previos ha de evaluarse la semana gestacional en la que ocurrieron y el diagnóstico etiológico si lo hubiere.

1.1.2 Exploración ginecológica

Se realizará exploración ginecológica completa con citología cérvico-vaginal. En caso de sospecha clínica de enfermedades de transmisión sexual deberán realizarse cultivos y pruebas pertinentes para su confirmación.

1.1.3 Evaluación tubárica

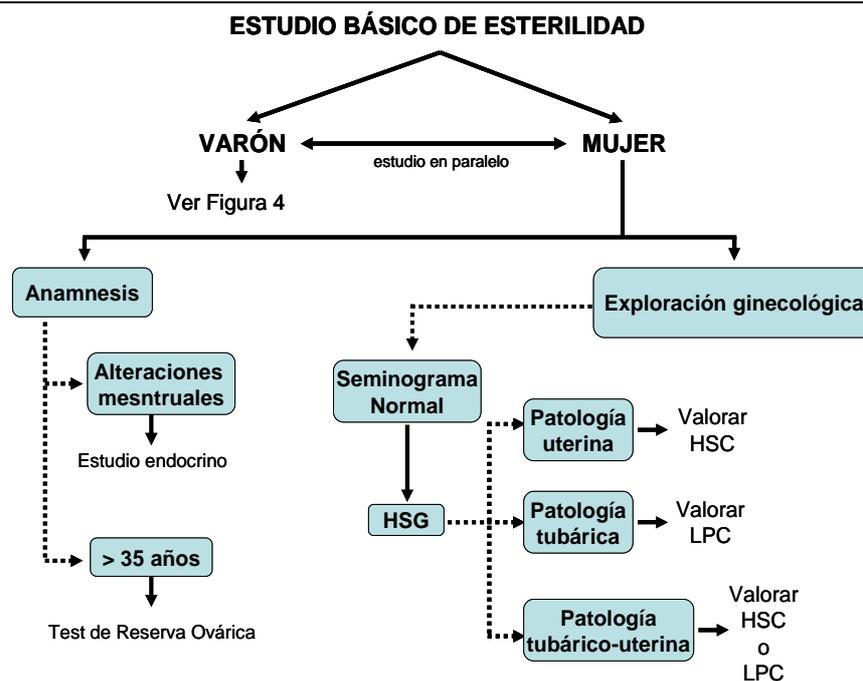
Si los resultados de la exploración ginecológica y la ecografía vaginal son normales, y el resultado del seminograma también es normal, se debe realizar una Histerosalpingografía –HSG- (visualización radiológica de la cavidad uterina y de las trompas mediante la introducción de un contraste radiopaco a través del cervix) para evaluar útero y trompas. Antes de la introducción de cualquier medio de contraste en el útero se recomienda profilaxis antibiótica, debido a que entre un 30 y un 60% de las pacientes con problemas de fertilidad presentan anticuerpos positivos en suero para *Chlamydia trachomatis* (Land et al., 2002).

Si el resultado de la HSG muestra anormalidades tubáricas se debe estudiar la presencia de *Chlamydia trachomatis* en el tracto genital femenino mediante estudio serológico de anticuerpos anti-*Chlamydia* o cultivo microbiológico. Si no presenta infección por este microorganismo se puede valorar la realización de una laparoscopia terapéutica, pero si el resultado es positivo se recomienda realizar FIV/ICSI.

Si el resultado de la HSG muestra anomalías intrauterinas se debe recomendar la histeroscopia. Esta técnica permite visualizar la cavidad uterina de forma precisa tras ser distendida con un medio salino. No obstante, se trata de un método invasivo y costoso, por lo que se reservará para ser realizada con fines terapéuticos (resección de tabique uterino, de pólipo o mioma submucoso). Sólo se realizará con fines diagnósticos cuando la HSG demuestre resultados dudosos.

Si la HSG muestra anomalías tanto en las trompas como en el útero se puede valorar realizar una laparoscopia. Esta técnica deberá realizarse tan solo bajo fuerte sospecha de patología con objeto de confirmarla e intentar tratarla en el mismo acto quirúrgico (adhesiolisis, quistectomía de endometriomas) (Opsahl et al., 1993; Jacobson et al., 2002).

Figura 1. Estudio básico de la pareja estéril.



HSG, histerosalpingografía; HSC, histerocopia; LPC, laparoscopia.

Algunos hallazgos del estudio básico de esterilidad llevarán a realizar otras pruebas diagnósticas (cariotipo, estudio de fibrosis quística, etc).

1.1.4 Esterilidad por factor masculino

Como ya se ha comentado, el factor masculino está presente, ya sea como factor único o de manera combinada con otro factor, aproximadamente en el 45-50% de las parejas estériles. La esterilidad masculina puede tener su origen en diversas causas o factores de riesgo que a menudo actúan conjuntamente. Algunas de ellas son identificables (obstrucción de los conductos eyaculadores o hipogonadismo hipogonadotrófico) y otras identificables pero no reversibles (atrofia testicular bilateral secundaria a orquitis urliana).

El propósito de la evaluación del varón es la identificación de alteraciones causantes de esterilidad. El tratamiento de las alteraciones reversibles puede incrementar la posibilidad de concepción mediante relaciones naturales o reproducción asistida. Por el contrario, la identificación de causas irreversibles y sin posibilidad de tratamiento evita a la pareja realizar tests diagnósticos inadecuados o intentar terapias ineficaces (Jarrow and Sigman, 1999).

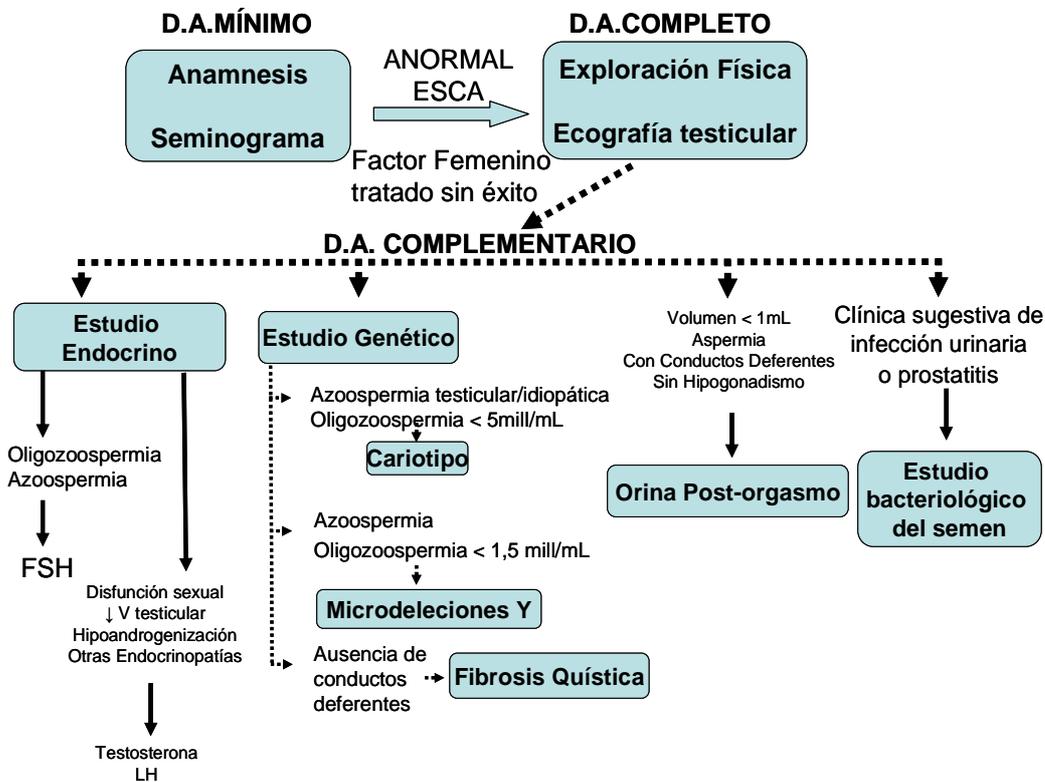
Por tanto, para el estudio de la esterilidad masculina se deben cumplir los objetivos que se describen a continuación.

- Identificar patologías y factores de riesgo que causan esterilidad masculina o que contribuyen a ella (Nieschlag and Behre, 1997).
- Orientar la estrategia terapéutica tratando o corrigiendo las causas cuando sea posible, o bien proponiendo las mejores alternativas en reproducción asistida (Weidner et al., 2002).
- Identificar anomalías genéticas transmisibles a la descendencia (Shah et al., 2003).
- Identificar patologías relevantes para la salud del varón (Honig et al., 1994).

La evaluación del varón programada y basada en criterios de medicina basada en la evidencia debe ser escalonada, iniciándose con el diagnóstico andrológico mínimo, continuándose con el diagnóstico andrológico completo, y

complementándose con aquellos tests o estudios que el clínico recomiende en base a los resultados de la evaluación completa (Figura 2).

Figura 2. Diagnóstico andrológico en el estudio de la pareja estéril.



1.1.5 Anamnesis del varón

La evaluación inicial del varón debe incluir la anamnesis y un seminograma.

- Historia médica

Se realiza para identificar factores de riesgo y patrones de comportamiento que pueden tener impacto significativo en la esterilidad masculina (gestación y parto propios, desarrollo y pubertad, historia genitourinaria, patologías de riesgo).

Ha de registrarse el consumo previo y actual de medicamentos y sustancias tóxicas.

- Historia reproductiva

- Duración de la esterilidad con la pareja actual y fertilidad previa.
- Enfermedades de la infancia e historia de desarrollo somático y puberal.
- Antecedentes quirúrgicos, historia sexual y genitourinaria, incluyendo enfermedades de transmisión sexual, exposición a gonadotoxinas (incluyendo altas temperaturas).
- Antecedentes de patología testicular (mal descenso, inflamación, traumatismos).
- Frecuencia coital y posibles disfunciones sexuales.

En caso de esterilidad secundaria ha de registrarse el tiempo requerido para lograr cada una de las gestaciones previas. Si hay abortos previos ha de evaluarse la semana gestacional en la que ocurrieron y el diagnóstico etiológico si lo hubiere.

- Historia familiar
 - Ha de incluir el número de hermanos, los antecedentes de enfermedades de padres y hermanos, especialmente esterilidad y anomalías hereditarias.

1.1.6 Análisis de semen

Para una correcta realización e interpretación de un análisis de semen deben tenerse presentes diferentes aspectos previos y posteriores al análisis, así como la utilización de técnicas y criterios reconocidos internacionalmente como los editados por la OMS o la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (Kvist and Björndahl, 2002), y aplicar procedimientos de control de calidad interno y externo.

Es importante tener en cuenta que los parámetros clásicos de semen (CSP) reflejan el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y nos orientan sobre patologías del sistema genital. Sólo excepcionalmente, como en casos de ausencia total de espermatozoides (azoospermia) o movilidad (astenozoospermia total), predicen la fertilidad del varón,

ya que dichos estados pueden ser transitorios y la esterilidad es un concepto que hace referencia a la pareja.

Los espermatozoides se acumulan en el epidídimo una vez que han sido liberados a la luz de los túbulos seminíferos. Cuando el contenido del epidídimo supera la capacidad del mismo, los espermatozoides rebosan y pasan a la uretra para ser eliminados con la orina (Cooper et al., 1993; De Jonge et al., 2004). La viabilidad del espermatozoide y de su cromatina se pueden ver afectadas por mayores tiempos de abstinencia sexual si existe algún trastorno funcional en el epidídimo (Correa-Pérez et al., 2004). Por ello es importante conocer el tiempo transcurrido desde la última actividad sexual, recomendándose el análisis de semen tras un período de abstinencia sexual de 2 a 7 días (WHO, 2010).

Sin embargo, también es importante reportar el período de abstinencia sexual desde la penúltima eyaculación debido a que el contenido del epidídimo no se vacía por completo tras una eyaculación (Cooper et al., 1993; Amann, 2010).

1.2 Causas de esterilidad

La esterilidad puede clasificarse atendiendo al origen de la misma:

- Factor masculino
- Factor femenino (endocrino, tubárico, uterino ó cervical)
- Factor mixto
- Esterilidad por causa desconocida (ESCA)

Si tras la realización de un correcto estudio de esterilidad encontramos alteraciones en la historia clínica, exploración física del varón o análisis de semen hablaremos de esterilidad por factor masculino.

Ante alteraciones endocrinas femeninas hablaremos de esterilidad por factor endocrino. La HSG y/o ecografía vaginal detectará alteraciones tubáricas o uterinas, hablando entonces de esterilidad por factor tubárico (tuboperitoneal) o factor uterino

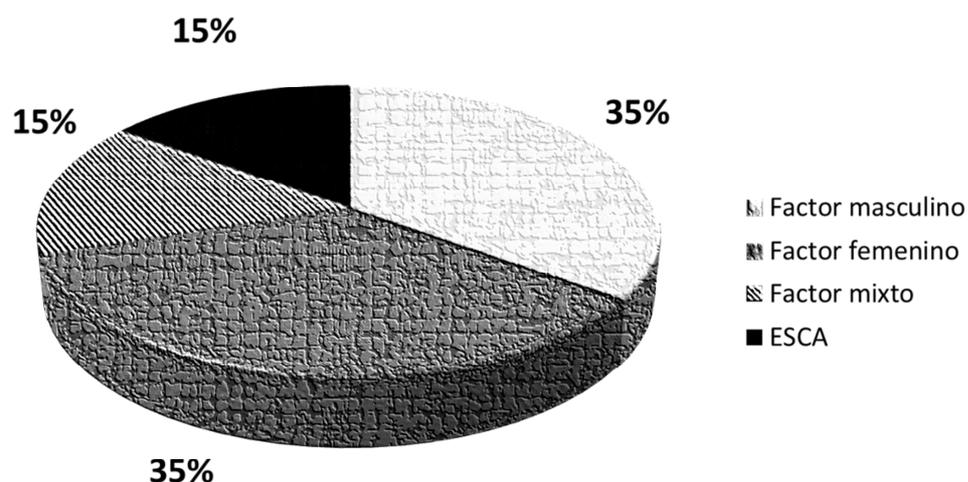
respectivamente. Los factores cervicales son una causa inusual de esterilidad, aunque vaginitis, cervicitis, traumatismos cervicales o cualquier situación que modifique el cérvix pueden tener un impacto negativo en el volumen o calidad del moco cervical y con ello imposibilitar la concepción (Matorras and Hernández, 2007).

No siempre hay una única causa de esterilidad, encontrándose dos o más causas en casi un 30% de los casos (Rantala, 1988).

No obstante, incluso tras la realización de las más sofisticadas pruebas diagnósticas, la etiología de la esterilidad se desconoce en el 15-30% de las parejas estériles (esterilidad sin causa aparente -ESCA-) (Vanrell et al., 1993). En ESCA de menos de 3 años de evolución y mujer menor de 35 años el pronóstico es bueno, incluso sin tratamiento (ESHRE Capri Workshop Group, 2009).

De manera global, el 35% de las parejas presentan esterilidad de causa femenina (endocrina, tubárica, uterina o cervical) y otro 35% de causa masculina. El 15% presentan alteraciones en ambos miembros de la pareja (esterilidad de causa mixta). Y por último, otro 15% no muestran alteraciones tras el estudio básico de esterilidad (ESCA) (Nicolás et al., 2004).

Figura 3. Causas de esterilidad



1.3 Tratamiento de la esterilidad

El 50% de las parejas estériles resolverán su enfermedad mediante tratamientos médicos adecuados (antibioterapia en caso de infecciones, tratamientos farmacológicos en caso de alteraciones endocrinas leves, cirugía, etc.) o medidas sexuales apropiadas (coito programado, apoyo psicológico, educación sexual, etc.) (González et al., 2007). Aproximadamente el 50% restante necesitará de técnicas de reproducción asistida para obtener una gestación.

2. Reproducción Asistida

La reproducción asistida engloba un conjunto de técnicas encaminadas a facilitar la fecundación del ovocito. Dentro de estas técnicas de reproducción asistida (TRA) se encuentran la inseminación artificial (IA), la fecundación in vitro (FIV) y la microinyección espermática intracitoplasmática (ICSI). En la mayoría de las técnicas de reproducción asistida es necesario realizar previamente tratamientos para la estimulación de la ovulación en la mujer, pues esto va a permitir aumentar considerablemente la tasa de éxito (ya que en vez de madurar un solo ovocito por ciclo se consigue que maduren varios). El seguimiento de la estimulación ovárica se realiza mediante ecografía ovárica vía vaginal únicamente (inseminación artificial) o acompañado de determinación de niveles séricos de estradiol (FIV/ICSI) (Matorras and Hernández, 2007).

2.1 Técnicas de Reproducción Asistida

2.1.1 Inseminación Artificial

Mediante la IA se depositan los espermatozoides en el tracto genital femenino. Según el tipo de semen utilizado la inseminación artificial se denomina:

- Inseminación artificial conyugal (IAC): inseminación artificial con semen de la pareja.
- Inseminación artificial de donante (IAD): inseminación artificial con semen de donante.

La inseminación puede ser intracervical o intrauterina según el lugar donde se deposite el semen. La tasa de embarazo es significativamente mayor con la inseminación intrauterina que con la inseminación intracervical, por lo que la primera es la más habitual (ESHRE Capri Workshop Group, 2009).

En la IAC la muestra de semen se obtiene por masturbación en el mismo día en que se va a realizar la inseminación. Se recomienda al varón una abstinencia sexual previa con el objetivo de maximizar la calidad de la muestra seminal en número y calidad de los espermatozoides. En la IAD el semen se descongela el mismo día de la inseminación, previa asignación del donante, según las características fenotípicas de la pareja (Clavero et al., 2007).

La muestra de semen se debe manipular en el laboratorio antes de la inseminación con dos objetivos. Primero, aislar un alto porcentaje de espermatozoides funcionales, con una alta movilidad y sin anomalías morfológicas de otros espermatozoides no viables, células y restos celulares presentes en el semen. Segundo, eliminar el plasma seminal (así como prostaglandinas, agentes infecciosos y otras sustancias presentes en él) que impediría la capacitación espermática (Sellés et al., 2004). Para ello se utilizan técnicas basadas en la movilidad espermática (swim-up) o en la diferente densidad espermática (gradientes de densidad).

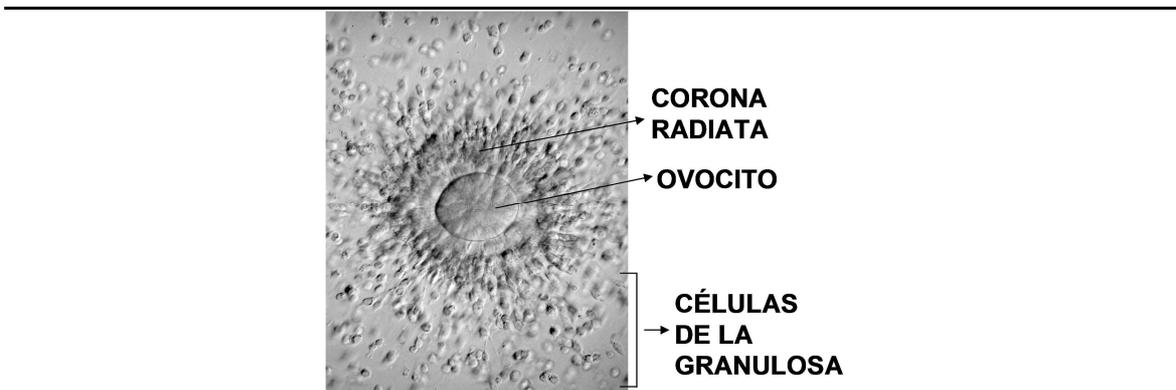
2.1.2 FIV/ICSI

La FIV hace referencia al desarrollo del embrión en el laboratorio desde de los primeros estadios hasta el día quinto o sexto tras la fecundación. Una definición adecuada del procedimiento conocido como FIV sería: fecundación y progreso de los primeros estadios embrionarios fuera del organismo. Según el método de fecundación podemos hablar de FIV convencional o de ICSI (Galán et al., 2004).

Como se ha comentado anteriormente, para llevar a cabo estas TRA es necesario realizar una estimulación de la ovulación en la mujer. Cuando, tras estimulación, los folículos ováricos ha alcanzado un tamaño entre 17 y 21 mm se procede a desencadenar la ovulación mediante la hormona gonadotropina coriónica (hCG), la hormona gonadotropina luteinizante recombinante (LHR) o agonistas de la

hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). A las 36 horas de esta inyección, mediante punción folicular ecoguiada, se procede a la aspiración de los folículos ováricos. El líquido folicular es trasladado al laboratorio de reproducción asistida donde se realiza la identificación de los complejos cúmulo-corona-ovocito (Figura 4).

Figura 4. Complejo cúmulo-corona-ovocito.



En función de la técnica que se vaya a emplear, FIV o ICSI, el tratamiento del complejo cúmulo-corona-ovocito será diferente. En la FIV convencional se cultiva cada complejo con los espermatozoides, seleccionados por las técnicas descritas anteriormente, a una concentración determinada, mientras que en ICSI se decumulan los complejos y cada ovocito será microinyectado con un espermatozoide. Al día siguiente se comprueba la fecundación, realizándose la transferencia de embriones al útero en estadio de células (día+2 ó día+3) ó de blastocisto (día+5 ó día+6). Los embriones sobrantes se crioconservan en nitrógeno líquido. En la figura 5 se esquematizan las diferentes etapas de laboratorio en FIV/ICSI.

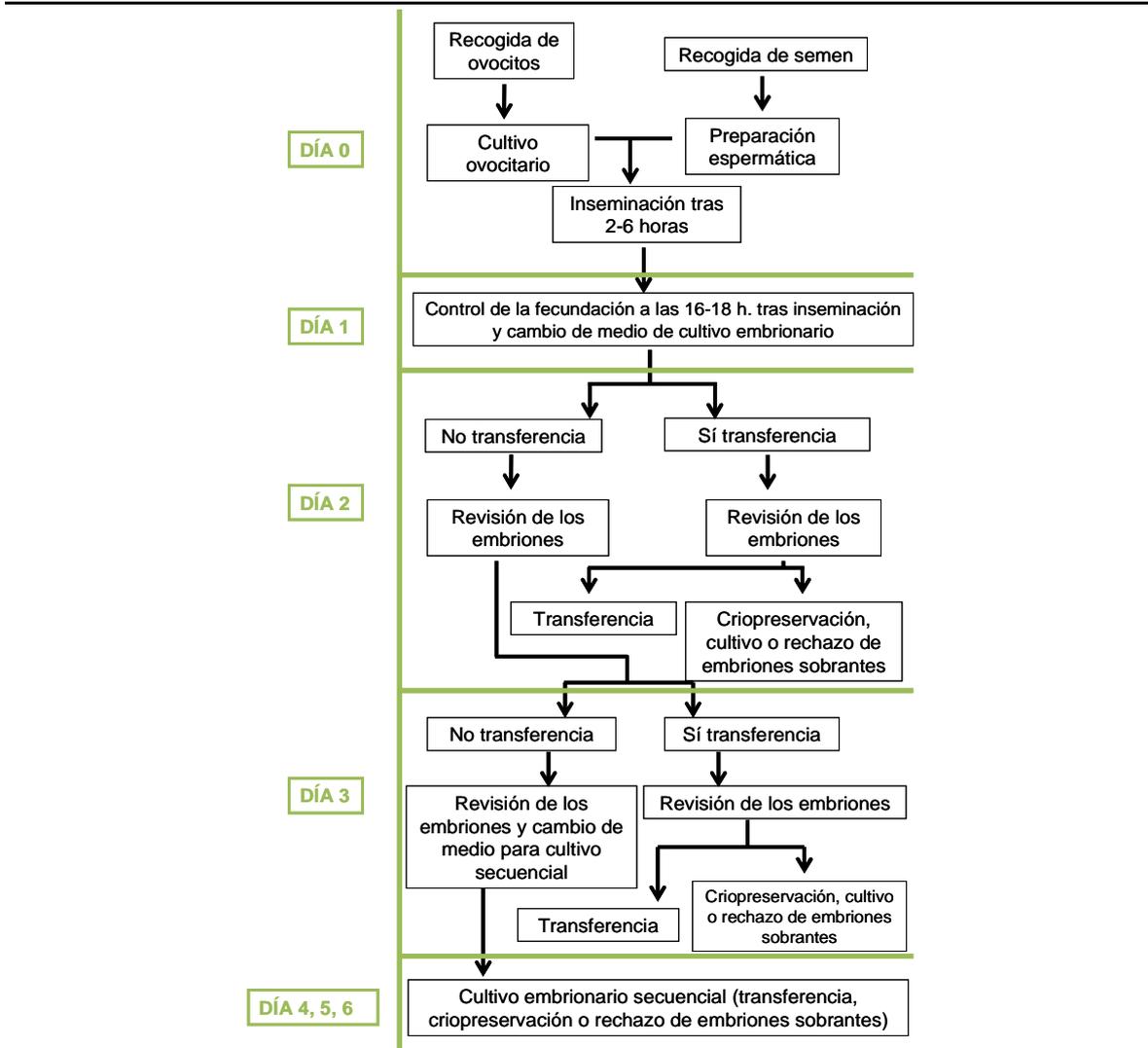
2.1.3 Otras técnicas

En determinadas situaciones clínicas, se ha sugerido incorporar otras técnicas de laboratorio al protocolo de FIV/ICSI clásico descrito. Entre estas tenemos la selección avanzada de espermatozoides, la eclosión asistida y el PGS (screening genético preimplantacional).

La selección de espermatozoides avanzada se realiza utilizando microscopía óptica de alta amplificación (IMSI) o mediante técnicas biológicas que seleccionan espermatozoides con determinadas características moleculares (receptores para Ac.

hialurónico ó aquellos que no expresen marcadores apoptóticos). La eclosión asistida consiste en realizar una apertura en la zona pelúcida del embrión que le facilite su abandono en el proceso de eclosión. Dicha apertura puede realizarse mediante láser, mecánica o químicamente (ácido tyrode) (Aragonés et al., 2004).

Figura 5. Etapas de laboratorio en FIV/ICSI.



El PGS consiste en biopsiar el embrión conseguido por FIV/ ICSI en estadio de 8 células ó blastocisto para determinar su contenido cromosómico ó génico mediante técnicas de hibridación in situ ó técnicas moleculares: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ó hibridación genómica comparada (CGH). Para obtener la biopsia se realiza una apertura en la zona pelúcida del embrión de igual modo que el indicado anteriormente para la eclosión asistida. También se puede biopsiar el primer o

segundo corpúsculo polar con el objeto de analizar su información genética (Aragonés et al., 2004).

Otra indicación de las técnicas de reproducción asistida es satisfacer los deseos reproductivos de parejas con enfermedades infecciosas transmisibles (HIV, hepatitis C,...) para reducir al mínimo el riesgo de contagio del otro miembro de la pareja o de la descendencia. En caso del varón seropositivo es necesario realizar una doble preparación del semen en el laboratorio (gradientes de densidad y después swim-up) y analizar la carga viral en esta muestra preparada. El manejo de los gametos y embriones de estas parejas debe realizarse bajo normas de seguridad biológicas adecuadas (Castilla and Magán, 2003).

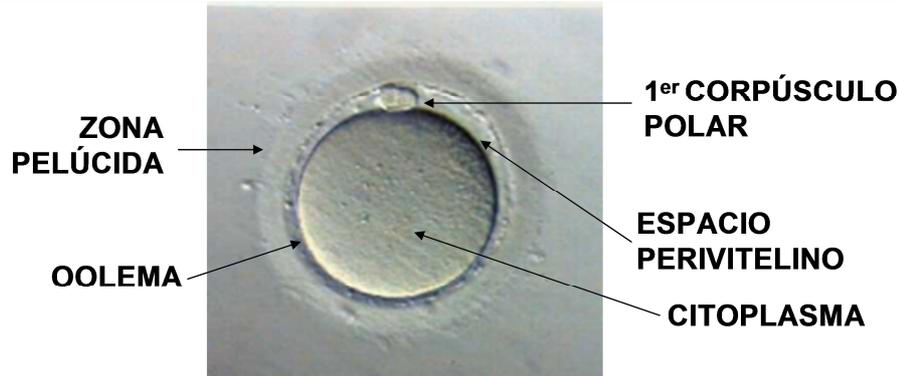
2.2 Evaluación ovocitaria

La valoración de la calidad de los ovocitos obtenidos mediante punción folicular tras estimulación de la ovulación se puede realizar desde la introducción de la ICSI mediante la evaluación de aspectos morfológicos del ovocito tras su denudación y su correlación con el resultado del ciclo de tratamiento.

Los ovocitos recuperados de pacientes sometidas a tratamiento de estimulación ovárica para realizar TRA pueden encontrarse en diferentes etapas del desarrollo meiótico. Sólo los ovocitos que se encuentran en el estadio celular de metafase II (morfológicamente se observa que ha extruido el primer corpúsculo polar) son utilizados para ICSI. En cambio, los ovocitos en fase celular metafase I (morfológicamente no se observa el primer corpúsculo polar extruido) o profase I (morfológicamente muestra una vesícula germinal) no pueden ser utilizados para ICSI. Además, los ovocitos metafase II gigantes (diámetro mayor a 200µm) serán descartados para la ICSI, ya que suelen resultar en fecundaciones anómalas: diginia y triploidía (Balakier and Cadesky, 1997).

Los ovocitos en metafase II de buena morfología presentan un citoplasma claro, con una granulosidad moderada, un pequeño espacio perivitelino, un corpúsculo polar intacto y una zona pelúcida sin color (Figura 6).

Figura 6. Esquema de un ovocito en metafase II con buena morfología.



Sin embargo, más de la mitad de los ovocitos recuperados en un ciclo de FIV/ICSI muestran por lo menos una anomalía morfológica. Estas anomalías se pueden subdividir en citoplasmáticas o extracitoplasmáticas. Las primeras incluyen granulosis o decoloración del citoplasma, agregación del retículo endoplásmico liso, vacuolización y presencia de incorporaciones en el citoplasma como cuerpos refringentes: cuerpos necróticos o picnóticos. Estas anomalías reflejarían defectos intrínsecos del ovocito en detrimento de su viabilidad. Las segundas incluyen irregularidades en la forma del ovocito, espacio perivitelino aumentado, presencia de restos en el espacio perivitelino, fragmentación del primer corpúsculo polar, así como consistencia anormal del oolema y de la zona pelúcida. Algunos de estos defectos se han asociado con una disminución de la tasa de supervivencia del ovocito tras la ICSI, pero no con la fecundación y calidad embrionaria.

Serhal et al. (1997) y Loutradis et al. (1999) reportaron mayores tasas de embarazo en pacientes con transferencia de embriones procedentes de ovocitos normales frente a pacientes con transferencia de embriones procedentes de ovocitos con anomalías citoplasmáticas. Kahraman et al. (2000) encontraron menores tasas de embarazo a término en pacientes con ovocitos con citoplasma granuloso, y Alikani et al. (1995) observaron una disminución significativa en la pérdida preclínica de embarazo en pacientes con transferencias de embriones procedentes de ovocitos de buena morfología.

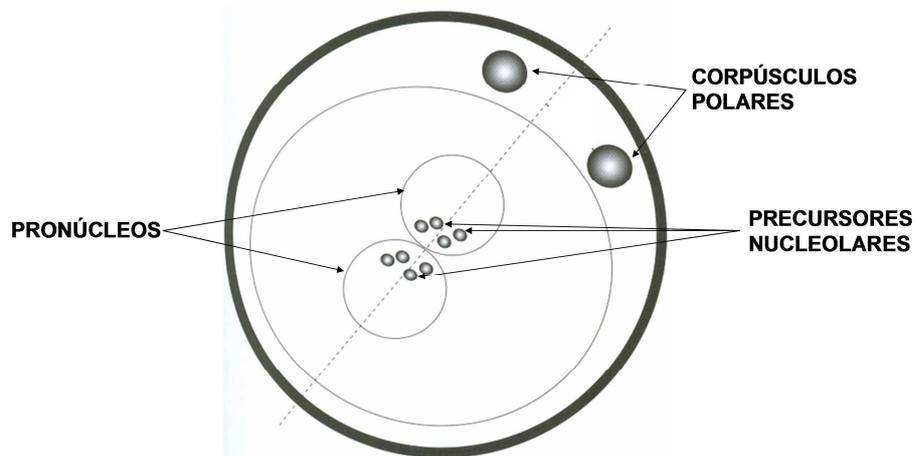
Actualmente, a excepción de los megaovocitos, no se suele considerar la calidad ovocitaria en la selección embrionaria, pues no todos los autores han

observado las comentadas asociaciones entre morfología ovocitaria y embrionaria (De Sutter et al., 1996).

2.3 Evaluación del cigoto

La selección embrionaria será el resultado de la evaluación global del embrión: desde el estadio de cigoto hasta el día de la transferencia. La valoración del cigoto se realiza mediante la evaluación de parámetros morfológicos de los pronúcleos masculino y femenino, así como de sus precursores nucleolares tras 16-18 horas post inseminación mediante FIV o ICSI (Figura 7).

Figura 7. Esquema de un cigoto.



Los acontecimientos que se han podido observar en el ovocito tras una fecundación normal mediante ICSI se describen a continuación. Tras realizar la ICSI el ovocito muestra “ondas” circulares de granulación en el ooplasma con una periodicidad de 20 a 53 minutos. Durante esta fase de granulación la cromatina del espermatozoide se descondensa. A continuación el segundo corpúsculo polar es extruido y el pronúcleo masculino se forma en la zona central del ovocito. Acto seguido se forma el pronúcleo femenino que migra hacia la zona central del ovocito para encontrarse con el pronúcleo masculino. Ambos pronúcleos aumentan su tamaño y los precursores nucleolares se desplazan por el interior de cada pronúcleo para alinearse y quedar enfrentados.

Mientras que los pronúcleos se clasifican en base a la simetría, posición y localización de los mismos, los precursores nucleolares se evalúan en base al número, simetría y localización de los mismos. Sadowy et al. (1998) encontraron una fuerte correlación entre mosaicismo embrionario y cigoto con pronúcleos de diferente tamaño. Por otro lado, diferentes autores encuentran que el desarrollo del embrión en etapas tempranas puede verse afectado cuando se produce asincronía en la formación y polarización de los precursores nucleolares (Van Blerkom, 1990; Tesarik and Greco, 1999; Scott et al., 2000).

Otras características observadas para la clasificación del cigoto son la morfología y alineamiento de los corpúsculos polares el cual está relacionado con el eje polar de la primera división embrionaria, pudiendo producirse anomalías cromosómicas en el desarrollo embrionario si el alineamiento es incorrecto (Garello et al., 1999). Numerosos sistemas de gradación pronuclear han sido propuestos (Scott and Smith 1998; Tesarik and Greco 1999; Ludwig et al., 2000; Wittemer et al., 2000), pero actualmente no está en uso ningún sistema estandarizado para la gradación del cigoto. Ya que, como han demostrado los estudios de morfocinética embrionaria (Azzarello et al., 2012; Aguilar et al., 2014), tema que trataremos más tarde, el desarrollo pronuclear es un proceso dinámico y excluir un embrión basándose en una observación puntual puede llevar a errores (James et al., 2006).

Respecto a la morfología del citoplasma se evalúa la presencia de halo citoplasmático, la cual se produce por la redistribución de las mitocondrias alrededor de los pronúcleos, originando un anillo claro en la periferia del ooplasma. Diferentes publicaciones concluyen que la presencia de halo es una característica positiva, siempre y cuando no sea excesiva (Payne et al., 1997; Salumets et al., 2001; Zollner et al., 2002; Balaban and Urman, 2006). No obstante, esta característica corresponde a un proceso dinámico que puede no observarse en el cigoto en el momento de su evaluación, por lo que otros autores no consideran que sea un parámetro a tener en cuenta en la evaluación del mismo (Payne, 1997).

Finalmente, se puede realizar una segunda evaluación embrionaria 25-27 horas post-inseminación para evaluar la presencia o ausencia de los pronúcleos y/o la división temprana a dos células. Los estudios que evalúan la división temprana a

las 25-27 horas post-inseminación, intentan correlacionar este parámetro con la morfología embrionaria en d+2 y d+3 (Lundin et al., 2001; Ciray et al., 2006), el desarrollo a blastocisto (Neuber et al., 2003), la viabilidad embrionaria (Shoukir et al., 1997; Salumets et al., 2003) y la tasa de implantación (Rienzi et al., 2005; Ciray et al., 2006), pero sus conclusiones son contradictorias..

2.4 Evaluación embrionaria: Morfología estática

La valoración morfológica del preembrión ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria. Para realizar esta valoración el embrión se observa en el intervalo de 44-47 horas post inseminación (día+2) y 67-71 post inseminación (día+3).

Los criterios más utilizados para seleccionar el número óptimo de embriones a transferir y reducir la incidencia de embarazo múltiple son: número de células, simetría celular, sincronía de división celular, porcentaje y tipo de fragmentación celular, visualización de núcleos y grado de multinucleación.

Número de células y ritmo de división

La cinética de división embrionaria hace referencia al número de células que se pueden observar en el embrión en sus diferentes estadios de desarrollo. Estos valores esperados quedan reflejados en la figura 8.

Figura 8. Cinética de división embrionaria esperada en FIV/ICSI usando evaluación estática.

Ovocito			
Cigoto	—————→	16-18 horas post-inseminación	—————→ 2 pronúcleos
Borrar pronúcleos	———→	20-23 horas post-inseminación	—————→ ausencia de pronúcleos
División temprana	———→	25-27 horas post-inseminación	—————→ 2 células iguales
día+2	—————→	44-47 horas post-inseminación	—————→ 4 células iguales
día+3	—————→	67-71 horas post-inseminación	—————→ 8 células iguales
día+4	—————→	94-98 horas post-inseminación	—————→ mórula
día+5	—————→	112-120 horas post-inseminación	—————→ blastocisto temprano
día+6	—————→	136-140 horas post-inseminación	—————→ blastocisto expandido

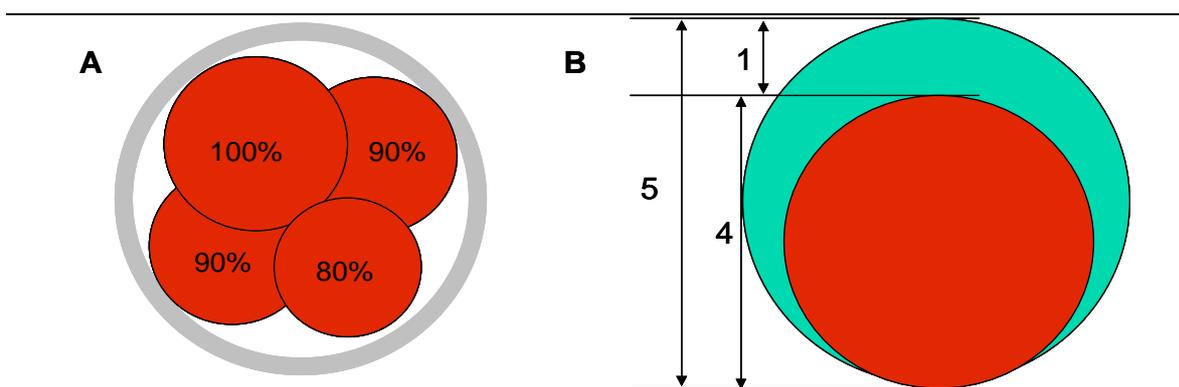
Fragmentación citoplasmática

Es necesario evaluar el grado de fragmentación, el tamaño y la distribución de los fragmentos. Respecto al grado de fragmentación citoplasmática, se estima como un porcentaje, no repercutiendo en la tasa de implantación si es inferior al 20-25% (Ziebe et al., 1997; Van Royen et al., 1999; Alikani et al., 2000; Hardarson et al., 2001; Racowsky et al., 2003). En lo que respecta al tamaño y distribución de los fragmentos, son los de gran tamaño y los repartidos por todo el embrión los que mayor influencia negativa tienen sobre la tasa de implantación (Alikani and Cohen, 1995; Alikani et al., 2000).

Simetría celular

El tamaño de las blastómeras también es un factor útil para estudiar el potencial de desarrollo e implantación de los embriones (Hardarson et al., 2001). Una división desigual origina blastómeras de diferente tamaño con distinta distribución del material genético, lo cual repercute negativamente en el potencial de implantación (Steer et al., 1992; Van Blerkom et al., 2000; De Placido et al., 2002; Hnida et al., 2004; Veek et al., 1999a). Según Hardarson et al. (2001), un preembrión de 4 células con división asimétrica es aquel en el que la diferencia entre el diámetro de las blastómeras mayor y menor supera el 20%. En la figura 9 se muestra un esquema de un embrión que presenta asimetría entre sus blastómeras.

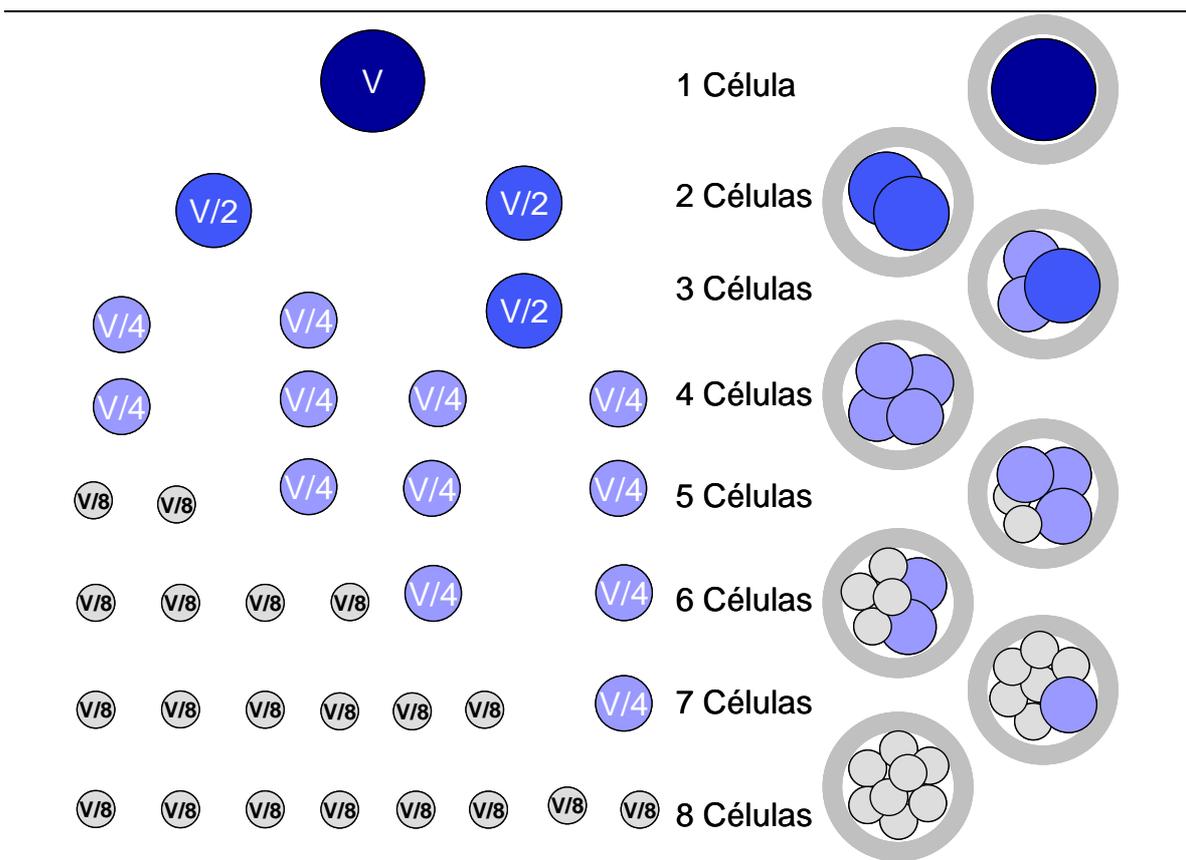
Figura 9. Asimetría en la división celular embrionaria.



En la figura 9.A se muestra un embrión en el que existe una diferencia de volumen del 20% entre sus blastómeras. Y en la figura 9.B se superponen 2 blastómeras con una diferencia de tamaño del 20%.

No obstante, a veces la asimetría entre blastómeras puede ser normal, pues se debe a una asincronía en la división celular. En la figura 9 se muestra la asimetría embrionaria que corresponde con asincronía en la división celular para embriones en día+2 y día+3 (Roux et al., 1995; Holte et al., 2007).

Figura 10. Embriones con asimetría entre sus blastómeras por asincronía en la división celular.

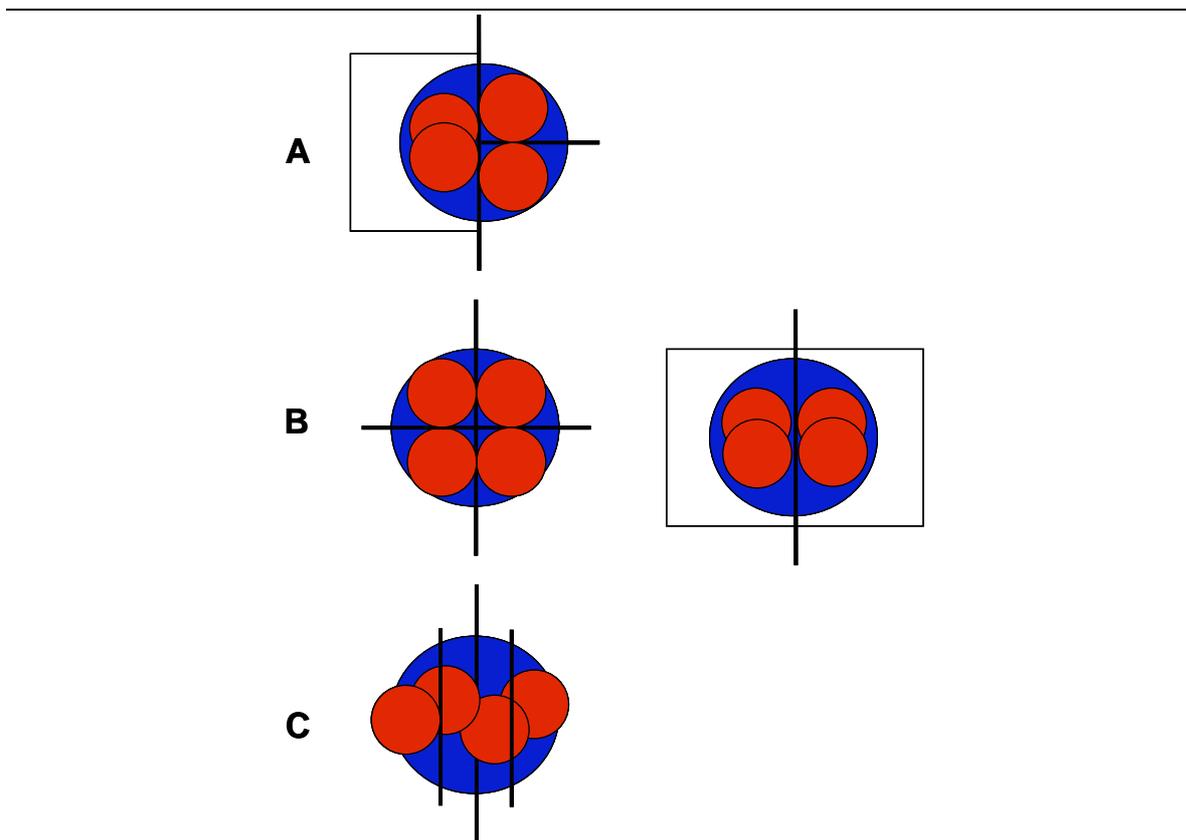


Es necesario saber distinguir una blastómera de un resto citoplasmático. Johansson et al. (2003) determinó el diámetro normal de las blastómeras, resultando de 65-70µm en día+2 y algo menor en día+3 (55-60µm). El diámetro límite por debajo del cual definieron resto citoplasmático, ya que los “fragmentos” analizados no mostraron material genético, fue 45µ en día+2 y 40µ en día+3.

Otro aspecto de la división celular que se puede evaluar en el embrión en día+2 es el plano de división de las blastómeras. El embrión presentará una

determinada disposición de las blastómeras en función de la orientación de los planos de división para pasar de 2 a 4 células (Figura 11).

Figura 11. Planos de división embrionaria.



Holte et al. (2007) encontraron mayores tasas de implantación cuando los planos de la segunda división son perpendiculares entre sí, como se muestra en la figura 10.A. En la figura 10.B y 10.C los planos de la segunda división celular son paralelos entre sí, y perpendiculares (10.B) o paralelos (10.C) al plano de la primera división celular.

Visualización de núcleos y grado de multinucleación

La presencia de dos o más núcleos o de micronúcleos en una célula tiene una correlación directa con el incremento en la tasa de anomalías cromosómicas embrionarias (Hardarson et al., 2001). La presencia de blastómeras multinucleadas

implica bajo potencial de implantación y aumento en la tasa de aborto (Jackson et al., 1998; Pelinck et al., 1998; Van Royen et al., 2003; Meriano et al., 2004).

Sistemas de clasificación en evaluación embrionaria

Numerosos sistemas de clasificación embrionaria han sido creados teniendo en cuenta diversos aspectos de los comentados anteriormente, con la finalidad de seleccionar para la transferencia los embriones con mayor potencial de implantación (Cummins et al., 1986; Hill et al., 1989; Staessen et al., 1992; Steer et al., 1992; Giorgetti et al., 1995; Bras et al., 1996; Rijnders et al., 1998; Alikani et al., 1999; Antczak et al., 1999; Avery and Brinsden, 1999; Veeck et al., 1999; Ardoy et al., 2008). Sin embargo, aunque existe cierto acuerdo sobre qué es un buen preembrión y qué es un mal preembrión, la ausencia de criterios comunes afecta tanto a los parámetros a evaluar como a los puntos de corte entre categorías.

Con la intención de unificar criterios de evaluación embrionaria la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) ha desarrollado un sistema de gradación de la calidad embrionaria para las transferencias en día+2 y día+3 de desarrollo embrionario (Ardoy et al., 2008). En las figuras 12 y 13 se muestran los esquemas de esta clasificación morfológica para transferencias en día+2 y día+3 (basándose principalmente en número de células, simetría, porcentaje de fragmentación, multinucleación y presencia de vacuolas).

Figura 12. Calidad embrionaria en día+2 según ASEBIR (Ardoy et al., 2008).

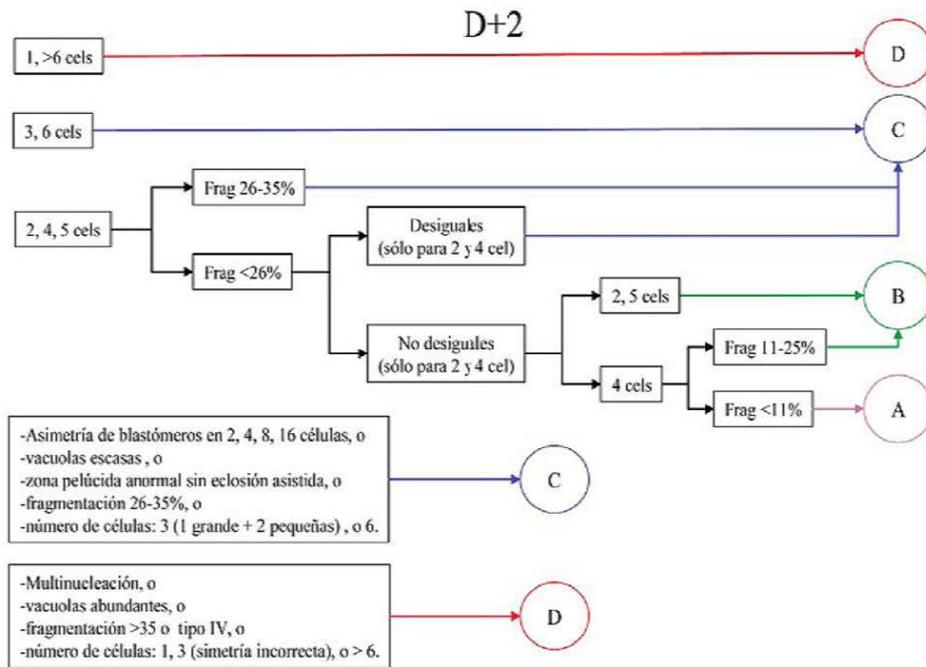
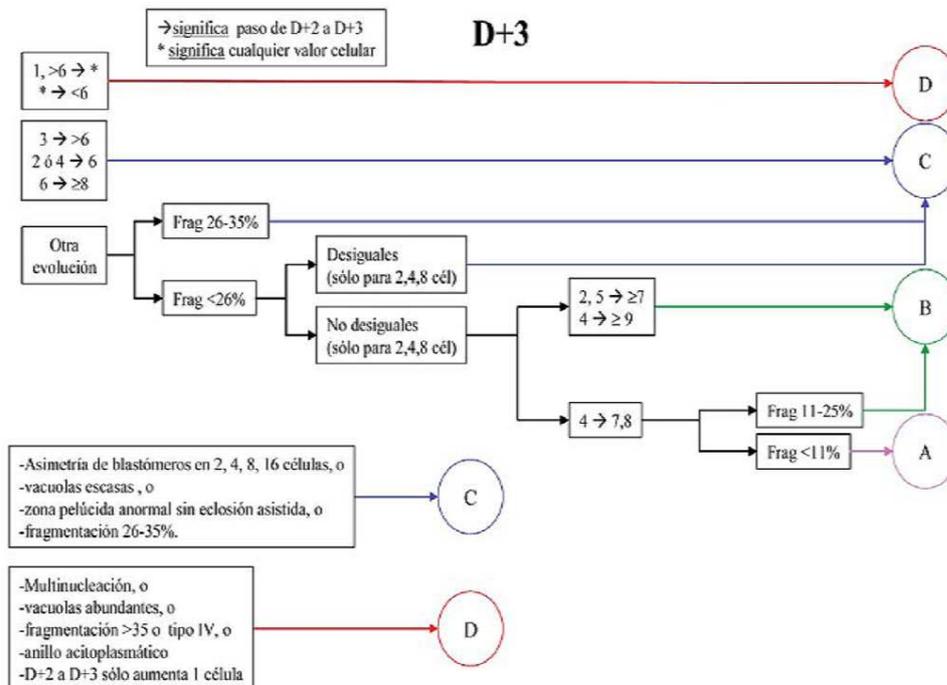


Figura 13. Calidad embrionaria en día+3 según ASEBIR (Ardoy et al., 2008).



Evaluación de blastocistos

El cultivo secuencial de embriones hasta estadio de blastocisto en día+5 de desarrollo es una técnica no-invasiva de selección embrionaria que puede contribuir a una mejor selección.

El desarrollo embrionario se encuentra sujeto a los transcritos de origen materno hasta día+3, momento a partir del que se activa el genoma embrionario. Únicamente cultivando los embriones hasta estadio de blastocisto podremos identificar aquellos embriones con bloqueo de desarrollo en día+3.

El estado del embrión en día 5 ó 6 de desarrollo puede variar desde una etapa más retardada de compactación hasta una etapa más avanzada de blastocisto expandido. La calidad de este último se determina por la formación de una cavidad diferenciada rellena de líquido (blastocelo), las capas de células circulares externas que rodean a esta cavidad (trofoectodermo) y el conjunto de células internas que conforman las células de la masa interna (CMI) (Figura 14), cuyo tamaño ha sido considerado el factor más importante para una implantación exitosa (Richter et al., 2001).

Figura 14. Esquema del blastocisto expandido.



Al igual que para embriones en día+2 y día+3 de desarrollo, ASEBIR ha publicado un sistema de gradación de embriones en día+5 y día+6 (Figura 15)

Figura 15. Calidad embrionaria día+5 y día+6 según ASEBIR (Arday et al., 2008).

CALIDAD	Organización en blastocisto	Zona pelúcida	MCI	Tamaño MCI *	trofoctodermo	Grado de expansión **
Blastocisto A	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800 μm^2 - 1900 μm^2	Epitelio homogéneo Células elípticas	El blastocelo ocupa todo el volumen del preembrión
Blastocisto B	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800 μm^2 - 1900 μm^2	Epitelio irregular	
Blastocisto C	En D+6			< 1900 μm^2	Epitelio homogéneo Células elípticas	
Blastocisto D	En D+6			< 1900 μm^2	Epitelio irregular Células escasas	

* 3.800 μm^2 es comparable al tamaño de un blastómero de un preembrión en estadio de 4 células.

** Blastocisto colapsado: es un mecanismo natural que tiene lugar en el estadio de blastocisto y que, si ocurre, habrá que observarlo de nuevo. No hará cambiar la categoría asignada al preembrión.

Tabla VI. Tabla de asignación de la calidad del blastocisto en función de las variables consideradas.

2.5 Evaluación embrionaria: Métodos dinámicos

La mejora en la evaluación morfológica de los embriones cultivados in vitro ha supuesto un gran avance en los últimos años en los programas de FIV/ICSI. Las determinaciones clásicas (estáticas) han sido complementadas con características morfocinéticas adicionales recientes (medidas mediante tecnología time-lapse) que están permitiendo, predecir y seleccionar aquellos embriones con mayor potencial implantatorio y con ello aumentar las probabilidades de que parejas infértiles logren un embarazo (Chen et al., 2013, Alter et al., 2014). Veamos a continuación algunos de los pros y contras de estos dos sistemas de evaluación embrionaria.

La evaluación morfológica clásica es un sistema ampliamente implantado en el laboratorio de reproducción asistida, estando los embriólogos clínicos familiarizados con su uso. Además existen programas de control de calidad externo desde hace varios años que aumentan su validez (Ruíz-Assin et al., 2009; Castilla et al., 2010). Sin embargo, de la evaluación morfológica basada en observaciones estáticas merece la pena destacar tres grandes desventajas. En primer lugar, la microscopía estática está vinculada a momentos puntuales con la consiguiente pérdida de información sobre el resto del desarrollo embrionario. Por otra parte, la microscopía estática inevitablemente perturba las condiciones óptimas de cultivo. Y por último, solo permite interpretaciones cualitativas altamente subjetivas y propensas a variaciones intra e interobservador.

Por otro lado, las diferentes plataformas de morfocinética ofrecen la posibilidad de cultivar embriones en un entorno muy controlado capturando a su vez imágenes a intervalos de entre 5 y 20 minutos.

Esto ofrece varias ventajas con respecto a la microscopia estática convencional. Permite el mantenimiento de condiciones óptimas de cultivo durante todo el desarrollo embrionario debido a que el pH, la temperatura y la humedad son importantes para el correcto desarrollo de los embriones in vitro, y es imposible evitar que estos parámetros no se alteren mientras realizamos microscopía convencional. Sin embargo, en las plataformas de morfocinética los embriones no necesitan ser extraídos de la incubadora hasta el momento de la transferencia embrionaria (TE).

Además, nos permite hacer el monitoreo continuo de los embriones ya que los mismos son cultivados directamente bajo una cámara, esto nos permite realizar determinaciones precisas de las divisiones celulares y una observación más cercana de acontecimientos morfológicos tales como el inicio de la compactación y la aparición de la cavidad del blastocele.

La mejora en las condiciones de cultivo y la disponibilidad de información objetiva, precisa, cualitativa y cuantitativa representa las principales ventajas de estos sistemas. Otra ventaja que podemos mencionar es la reducción de posibles errores en la clasificación de embriones.

El aspecto morfológico de un embrión puede cambiar en un periodo muy corto de tiempo lo cual conduce a decisiones diferentes con respecto al tipo y número de embriones a transferir. También cabe destacar el ahorro de tiempo ya que no es necesario entrar al laboratorio para la evaluación embrionaria y la disminución de los costes en los medios de cultivo, placas, aceite mineral y CO₂.

No obstante, los sistemas de morfocinética también presentan algunas limitaciones:

- Incapacidad de rotar los embriones en observación debido a la tridimensionalidad de estos. Por ejemplo: la multinucleación es claramente visible en un plano y en otros no.
- Posible desplazamiento de los embriones entre los pocillos, ya que cada uno de los embriones se encuentran en un micropocillo pero comparten la misma gota de medio de cultivo por encima. Lo cual puede ser problemático en pacientes de diagnóstico genético

preimplantacional donde asegurar un cultivo individual es prácticamente obligatorio.

- La aparición de burbujas en el medio de cultivo y dificultad para contar el número de células en estadios avanzados. Cuanto más avanzado y más fragmentado esté el embrión más difícil será contar el número de células y evaluar las divisiones celulares.

Otro aspecto controvertido de las plataformas de morfocinética es el tiempo definido como tiempo cero (t_0). Éste es una media de todos los ovocitos de la cohorte, por lo que hay un pequeño desfase ya que obviamente no todos los ovocitos se microinyectan exactamente al mismo tiempo. Sin embargo este desfase es muy pequeño y no afectaría a los resultados obtenidos. Debido precisamente a la necesidad de definir el (t_0), los ovocitos sometidos a FIV no serían idóneos para su evaluación morfocinética, lo cual limitaría su aplicación.

Por otro lado, en los sistemas de morfocinética, los embriones se exponen de manera periódica a la luz cada vez que se adquieren las imágenes que luego analizamos en forma de video. Sin embargo, numerosos estudios indican que esta exposición periódica a la luz no perjudica a la calidad embrionaria, siendo incluso menor la sumatoria de la exposición en morfocinética que la de la microscopía clásica al ser de mayor intensidad (Mio Y and Maeda K., 2008; Nakahara et al., 2010; Cruz et al., 2012; Meseguer et al., 2012).

Por todo lo anterior, las observaciones con morfocinética presentan la oportunidad de optimizar la selección embrionaria, basada en diferentes grados morfológicos, proporcionando nuevos parámetros morfocinéticos, los cuales pueden mejorar la precisión a la hora de seleccionar los embriones más viables (Azzarello et al., 2012; Campbell et al., 2013; Chamayou et al., 2013; Chávez et al., 2012; Hlinka et al., 2012; Rubio et al., 2012). Estos sistemas nos proporcionan una gran cantidad de datos e imágenes que nos permitirán detectar eventos que normalmente se producirían entre una observación y otra (y que no veríamos si estuviéramos haciendo una microscopía convencional) como por ejemplo: divisiones irregulares, formación y reabsorción de fragmentos, aparición/desaparición de multinucleación,

cambios en la simetría de blastómeras, divisiones directas de 1 a 3 células (Meseguer et al. 2011).

Diversos estudios han intentado establecer una correlación entre los parámetros morfocinéticos y la posibilidad de éxito en las TRA.

Lemmen et al. (2008) demostró que los embriones implantados presentaban una desaparición precoz de los pronúcleos y una rápida primera división. También ellos se observó una correlación entre una mayor tasa de embarazo y la sincronía en la re-aparición de los núcleos en las dos blastómeras formadas después de la primera división.

Por otra parte, Wong et al. (2010) encontraron que el desarrollo de embriones humanos en las etapas de blastocisto se correlacionó con: (i) la duración de la primera división citoplasmática de una célula a 2 células, (ii) el tiempo entre 2 células y la división a 3 células y (iii) el tiempo entre la división de 3 a 4 células.

Meseguer et al. (2011) encontraron que los parámetros más predictivos de implantación fueron: el tiempo de división de 5 células, t_5 (48,8 a 56,6 h después de la ICSI); el tiempo entre la división de 3 a 4 células, s_2 ($\leq 0,76h$) y la duración del segundo ciclo celular, es decir, tiempo entre la división de 2 y 3 células, cc_2 ($\leq 11,9$).

De entre los recientes trabajos sobre morfocinética embrionaria, merece la pena destacar tres:

- Campbell et al. (2013) utilizando time-lapse demostraba que embriones con aneuploidias empezaban la blastulación más tarde. Además la expansión completa del blastocisto también se alcanzaba con mayor retraso que en los embriones euploides.
- Hashimoto et al. (2012) llevaron a cabo un estudio en el cual se tomaban 6 imágenes de los embriones por hora durante cinco días, sus resultados muestran que aquellos embriones capaces de completar la segunda y tercera división más rápido tenían un desarrollo mejor que aquellos embriones con patrones de división más lentos.

- Dal Canto et al. (2012) también observaron que las divisiones celulares tempranas podían relacionarse con la capacidad de un embrión de evolucionar a blastocisto e implantar. Observaron patrones de división similares hasta 6 células de embriones capaces de evolucionar hasta blastocisto, y destacaron la importancia de los tiempos en los cuales los embriones alcanzaban estadios de 7 y de 8 células. Al analizar el potencial de implantación, vieron que aquellos embriones que implantaban alcanzaban las 8 células antes que aquellos que no implantaban. Concluyeron que las divisiones de dos a ocho células ocurren antes en embriones con capacidad de desarrollarse a blastocisto y de implantar correctamente. Una vez más, este estudio confirma que la evaluación embrionaria en día 2- 3 de desarrollo es crucial para realizar una evaluación precisa y acertada.

Todos estos estudios coinciden en que la selección embrionaria puede realizarse añadiendo criterios morfocinéticos a los criterios clásicos. Sin embargo, como hemos visto existen discrepancias entre los diferentes estudios sobre qué parámetros morfocinéticos utilizar para una mejor selección embrionaria (Kaser and Racowshy, 2014). Además, no existen estudios de calidad (ensayos clínicos) que demuestren la utilidad de estos sistemas en el aumento de la probabilidad de gestación. Ni se han analizado la correlación de las diferentes plataformas.

Por otra parte, la viabilidad embrionaria se ve influida por diferentes variables clínicas propias de la pareja, del ciclo de estimulación de la ovulación y del cultivo embrionario. Por tanto es lógico que los valores de morfocinética embrionaria se vean influidos por algunas de estas variables. (Fréour et al., 2013; Muñoz et al., 2013; Meseguer et al., 2011; Wong et al., 2010; Basile et al., 2013). Esto obliga a la hora de analizar los parámetros morfocinéticos a controlar estos factores de confusión. Procedimiento que obliga a disponer de una gran cantidad de datos que permitan obtener conclusiones robustas. (Cruz et al., 2012; Dal Canto et al., 2012; Herrero et al., 2013; Meseguer et al., 2012).

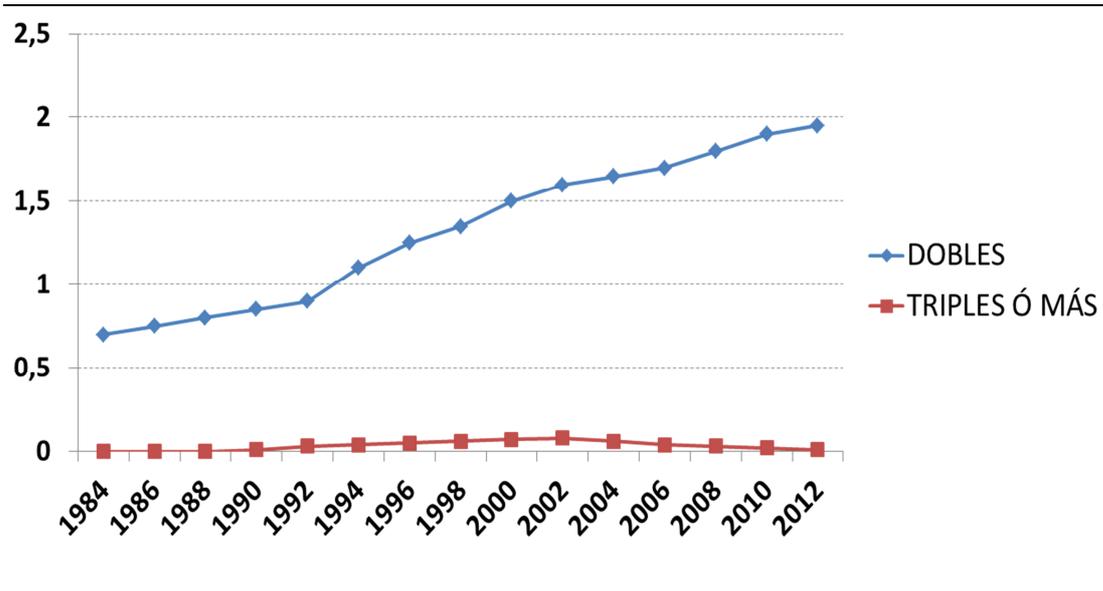
3. Efectos adversos de las técnicas de Reproducción Asistida

3.1 Gestación Múltiple

La complicación más importante asociada a las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) es la gestación múltiple, dada su elevada frecuencia y las complicaciones asociadas para los recién nacidos. Los datos del registro europeo del 2014 (Kupka et al., 2014) sitúan en un 20.6% la tasa de parto múltiple en Europa (partos dobles más triples tras FIV+ICSI), mientras que en España es de un 24,0%.

El incremento de gestaciones múltiples vinculadas a la expansión de las técnicas de fertilidad fue de tal dimensión que los especialistas no dudaron en calificar este fenómeno como una epidemia (Simon y Pellicer, 2005). Los registros de población española ponen de manifiesto que entre 1980 y 2012 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) (Tur et al., 2005).

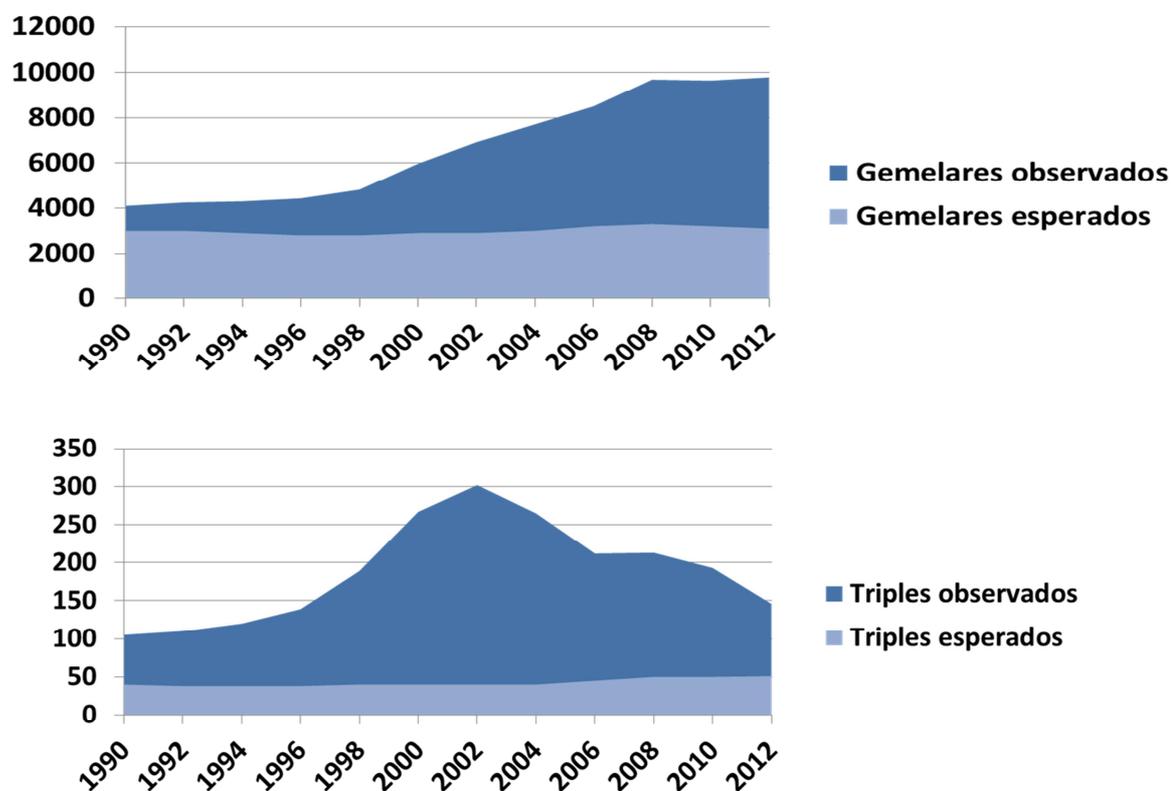
En la Figura 4 se muestra el aumento progresivo de la multiplicidad en los partos desde el año 1984 hasta el 2012. A partir del 2002 se observa una disminución en los partos triples y de más de tres (INE), pero no de dobles.

Figura 16: Partos múltiples en España 1984-2012.

En base a la misma fuente de datos (INE) y para evidenciar el incremento de los embarazos múltiples, supuestamente debidos a las 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 90 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 (Tur y cols., 2005).

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 (Figura 17) (Tur et al., 2006).

Figura 17. Incidencia partos gemelares/triples en España 1990-2012. Datos INE.



Las causas hay que buscarlas en primer lugar en el incremento en la edad de la maternidad y en segundo lugar y más importante al desarrollo de las TRA (Doyle, 1996), debido a que en la fecundación in vitro habitualmente se transfiere más de un embrión; y a que en la inducción/estimulación de la ovulación (asociados o no a IA) puede madurar más de un folículo.

La reacción a este aumento de embarazos múltiples en TRA ha consistido principalmente en disminuir el número de embriones transferidos en fecundación in vitro, dada la evidencia científica de que en parejas de buen pronóstico las tasas de gestación no son mayores en mujeres que reciben tres embriones que en las que reciben dos, siendo sin embargo menores las tasas de gestación múltiple en las últimas (Templeton et al., 1998; Wimalasundera et al., 2003; Dowling-Lacey et al., 2007; Pandian et al., 2013).

Los efectos secundarios materno-fetales de este tipo de gestaciones (cuádruples, triples, incluso las gemelares) (Stromberg y cols., 2009) inciden de forma tan gravosa en la pareja (coste económico, desgaste psicológico, depresión, etc.), y en el feto (bajo peso, alteraciones neurológicas, etc) que cada vez son más los países y las organizaciones científicas que se han decidido a regular mediante legislación la actividad de los centros o a crear recomendaciones sobre el número de embriones a transferir, con el fin de controlar las pautas existentes de actuación del binomio doctor-pareja basada en el principio de conseguir un embarazo a todo coste (Ricciarelli; 2007). Para ello se hace necesaria una correcta identificación de los embriones con mayor poder implantatorio, así como la determinación de los factores que predicen un riesgo elevado de gestación múltiple en una pareja concreta. Todas estas dificultades se encuentran entre las citadas por los centros a la hora de implantar una política de transferencia con un menor número de embriones. Ampliemos los diferentes aspectos que acabamos de comentar.

3.2 Implicaciones en la Salud de los embarazos gemelares.

Del total de embarazos gemelares, obtenidos por reproducción natural, dos tercios son dizigóticos (DZT) y un tercio monozigóticos (MZT). Entre estos últimos, en función de cuándo se haya producido la división que dará lugar a los dos fetos, habrá una sola placenta y dos bolsas amnióticas (si es alrededor de los tres días), o dos placentas y dos bolsas (nueve días) (Higueras, 2005).

Helmerhorst et al. (2004) describieron peores resultados perinatales de embarazos simples tras TRA que en embarazos naturales, pero para embarazos gemelares la diferencia fue menos clara, siendo la mortalidad perinatal menor en gemelos concebidos tras TRA.

Esto se debe a que los gemelos monocoriales presentan el riesgo más alto de peores resultados perinatales (Sébire et al., 1997). Alrededor del 20% de todos los gemelos son monocoriales, pero la proporción es mayor en embarazos espontáneos (30%) en comparación con los gemelos tras TRA (3,7-7%) (Chow et al., 2001; Derom et al., 2001; Lambalk and van Hooff, 2001).

Se ha observado que la incidencia de DZT es significativamente mayor tras TRA (80%) que en reproducción natural, además de un aumento de MZT (0,7-13%). Sin embargo, la verdadera incidencia de embarazos MZT después de TRA parece estar subestimada, debido en gran parte a que las gestaciones múltiples con dos placentas separadas (bicorial-biamniótica; DC-DA) ocurren después de las transferencias de varios embriones, y casi siempre se supone que son DZT (Bamforth et al., 2004; van Jaarsveld et al., 2012). En el estudio de Hall. (2003) encontraron que una proporción significativa (25-35%) de los embarazos MZT concebidos de forma natural eran bicoriales-biamnióticos.

Por otra parte, dado que el análisis genético no es realizado con tales DC-DA del mismo sexo después de las TRA de forma rutinaria, los investigadores no sólo son incapaces de determinar con precisión la frecuencia de MZT sino también para evaluar los factores de riesgo asociados a estos MZT (Knopman et al., 2014).

Varios estudios ponen en evidencia que los procedimientos específicos de las TRA juegan un papel importante en el aumento de MZT (protocolos de estimulación, características de los pacientes, la ICSI, la eclosión asistida, medios de cultivo) (Knopman et al., 2010; Skiadas et al., 2008; Aston et al., 2008; Esfandiari et al., 2009) y más recientemente el uso de ovocitos de donante (Knopman et al., 2010; Kawachiya et al., 2011).

En términos generales, entre los MZT una tercera parte tienen dos placentas (gestaciones bicoriales) y dos tercios comparten la misma placenta (monocoriales). Este grupo, que representa un 20% de todos los gemelos, es el que presenta los principales problemas de salud, más allá de los riesgos comunes a todos los embarazos gemelares (Knopman et al., 2014).

En estos embarazos existe peligro de retraso de crecimiento intrauterino, malformación fetal y de transfusión feto-fetal. Además, la morbilidad neurológica se multiplica en los gemelos monocoriales por 4 respecto a los bicoriales.

Mientras en los embarazos simples los riesgos son del 1% respecto a malformaciones severas, del 0,5% de muerte perinatal, del 3% de retraso en el

crecimiento intrauterino y del 1% de parto prematuro, en el caso de gemelos bicoriales las tasas son de un 1% de malformación, entre 1% y 2% de muerte perinatal, del 10% de retraso en el crecimiento y un 5% de parto pretérmino. Pero estas cifras se incrementan aún más en el caso de las gestaciones monocoriales con un 3% de malformaciones, entre 3% y 4% de muerte perinatal, un 15% de retraso en el crecimiento intrauterino y un 10% de prematuridad. A ello hay que sumar que en los monocoriales, las tasas de morbilidad al año o en la primera infancia, se multiplican por cuatro y hasta por cinco.

En la placenta monocorial hay comunicaciones arteriovenosas que se equilibran entre los dos fetos. Si se pierde este equilibrio se produce una transfusión feto-fetal, en la que hay un desequilibrio crónico, por lo que un feto se convierte en donante y desarrolla oliguria, oligodramios, y el otro en receptor, y desarrolla poliuria, polidramios e hidrops. No todas las gestaciones monocoriales desarrollan transfusión feto-fetal. Pero si sucede, en el estadio final la mortalidad es del 80% al 100%, sobre todo cuando aparece antes de la semana 26. Todos los monocoriales comparten comunicaciones vasculares, pero además, los gemelos se distribuyen la placenta de forma aleatoria, de forma que unos se quedan con más superficie placentaria y otros con menos. En este contexto se producen los retrasos de crecimiento intrauterino. Diversos estudios han reflejado los problemas entre gemelos monocoriales como por ejemplo el mayor riesgo de muerte intra-útero, de parto prematuro y de lesión neurológica de los gemelos monocoriales frente a los bicoriales (Perales-Marín et al, 2012).

No existe un acuerdo sobre si los embarazos gemelares de TRA tienen peor pronóstico que los naturales, ajustado por la corionicidad. Así, unos autores han encontrado peores resultados obstétricos (Ombelet et al., 2006) y otros no observan diferencias (Zaib-un-Nisa et al., 2003; Weghofer et al., 2009).

3.3 Implicaciones Económicas de los partos múltiples

Otro aspecto a tener en cuenta es el económico, dado que los costes de los partos simples son mucho menores que los de los gemelares o triples. Además, hay que sumar a éstos los costes de los tratamientos de las complicaciones que pueden surgir, tanto en la madre como en los recién nacidos, en los que a veces

son de por vida, como en el caso de la parálisis cerebral cuya incidencia afecta a un 1.5% de los gemelares y un 7-8% de los triples (Wimalasundera, 2003; Doyle, 1996).

Las repercusiones sociosanitarias de las gestaciones múltiples derivadas de FIV/ICSI y de sus consecuencias maternas y perinatales no han sido hasta la fecha objeto de un estudio de ámbito estatal. En 2002, un informe de la Subcomisión de Prestaciones del Consejo Interterritorial de la Salud, órgano asesor del Ministerio de Sanidad, señalaba que la prematuridad asociada a la mayor multiplicidad de las gestaciones obtenidas mediante FIV/ICSI eran una causa emergente de morbimortalidad que debía ser evaluada más profundamente (Ministerio de Sanidad y Consumo., 2002).

En un trabajo realizado en el País Vasco, el embarazo simple tuvo una posibilidad de parto pretérmino de un 6%, el gemelar del 55%; el triple del 90% y el cuádruple del 100%. Tomando como coste medio del neonato prematuro la cifra de 14.710 euros y teniendo en cuenta que el riesgo de que nazca prematuramente en embriones simples es del 6%, el coste medio de cada parto simple es de 882,6 euros. En gemelares esta suma se multiplica por 18 y asciende a 16.181 euros, en parto triple la cifra es 45 veces más elevada que en el simple y llega los 39.717 euros y en el caso del cuádruple se multiplica por 67 y se dispara hasta los 58.840 euros (Tabla 1) (Prieto, 2005).

Tabla 1. Coste aproximado del parto en función de la categoría (Prieto, 2005)				
	Simple	Gemelar	Triple	Cuádruple
% Partos pretérmino	6	55	90	100
Coste por neonato pretérmino en €	14.750€			
Coste medio total por parto en € (*)	882,6	16.181 (18)	39.717 (45)	58.840 (67)

*nº de veces respecto al parto simple.

Un estudio reciente realizado en el ámbito de la comunidad autónoma de Extremadura sobre datos procedentes del centro público de referencia regional para medicina reproductiva y de la UCI neonatal del mismo centro, estima un coste de la atención neonatal por parto único derivado de técnicas de

reproducción asistida de 1.445,27 euros, que ascendió a 17.414,21 euros para los partos gemelares (12 veces superior) y a 84.459,96 euros para partos triples (58 veces superior) (García-Malpartida et al., 2011).

Aunque de ámbito internacional, creemos significativo destacar los resultados de Dixon et al. (2008), los cuales estimaron los costes de conseguir un embarazo mediante técnicas de TRA en Reino Unido, incluyendo los costes de atención materna y pediátrica posteriores. Estos autores obtuvieron un coste de 8.817 libras para el embarazo simple, 22.081 para el gemelar y 65.297 para el triple.

Trabajos más recientes obtienen resultados similares (Chambers and Ledger et al., 2014). En nuestro país se ha estimado que por cada punto que desciende la tasa de embarazo múltiple obtenido para FIV/ICSI se reduce el gasto sanitario en casi 3 millones de euros (Cabello et al., 2010).

Por todo ello, países del norte de Europa han llevado a cabo modificaciones en las políticas de TE para disminuir la tasa de partos múltiples asociados a TRA, consiguiendo así importantes ahorros en coste sanitario (Peeraer et al., 2014).

4. Estrategias para disminuir el embarazo múltiple en FIV.

4.1 Programas nacionales para la reducción de la incidencia de las gestaciones múltiples.

En un análisis de la situación mundial realizado en 2007 por Ricciarelli. (2007a) podemos ver que los países que cuentan con una legislación con el propósito de reducir las gestaciones múltiples en TRA son muchos.

La reducción progresiva del número de embriones transferidos es una de las características que más diferencia la medicina reproductiva de los Estados Unidos respecto a Europa y sus áreas de influencia, así como entre diferentes países europeos considerados individualmente.

En Europa, la ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology), recomienda la transferencia de un sólo embrión en casos buen pronóstico (ESHRE 2001).

Sin embargo, y según los datos con los que cuenta la European IVF-monitoring- Consortium, ésta recomendación no es muy seguida por los países europeos. Según el último registro europeo, que reúne los ciclos del año 2010, en un 56,7% de los casos se realizaron transferencias de dos embriones mientras que sólo en un 25,7% de los casos se transfirió un embrión. (Kupka et al., 2014).

A continuación, analizaremos la situación de los diferentes países en términos de política de TE.

Reino Unido

Este país comenzó a aplicar una estrategia nacional para la reducción de gestaciones múltiples derivadas de FIV impulsada por la Human Fertilization and Embriology Authority (HFEA). Las primeras medidas consistieron en la limitación del número máximo de embriones por transferencia a tres en 1990 y a dos en 2001. Tras un primer período de análisis de resultados, se constató que la frecuencia de gestación múltiple, a expensas sobre todo de gestaciones gemelares, permanecía en torno al 25%. Por ello, la HFEA diseñó un segundo programa encaminado a lograr el descenso de la frecuencia de gestaciones múltiples hasta el 10%.

Este programa, cuya implantación progresiva comenzó por los centros públicos de reproducción asistida y se hizo extensivo a todos los acreditados en 2009, se basó en establecer como frecuencia de partida el 24% observado en 2009, fijar objetivos intermedios de reducción anuales del -20% para 2010 y solicitar a cada centro acreditado un plan específico de actuación en las pacientes con más riesgo de gestación gemelar tras FIV, basado en los propios datos de probabilidad de gestación e implantación. Cada centro es responsable de desarrollar una estrategia específica de reducción de la gestación múltiple, que debe ser documentada, comunicada a la autoridad sanitaria y evaluada

anualmente (HFEA 2007, HFEA 2009).

Recientemente, el Instituto Nacional de Salud y excelencia clínica de Reino Unido ha revisado sus recomendaciones (tabla 2), favoreciendo el eSET y recomendando que se realice en estadio de blastocisto. Asimismo, se recomienda no transferir nunca dos blastocistos de máxima calidad. A destacar también la necesidad de utilizar criterios estandarizados de evaluación embrionaria.

Tabla 2. RECOMENDACIONES DE LA GUÍA NICE (NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE, 2013).

<37 años	37-39 años	40-42 años
1 ^{er} ciclo: eSET 2 ^o ciclo: eSET (si 1 ó + embriones de máx. calidad disponibles	1 ^{er} y 2 ^o ciclo: eSET solo si 1 ó + embriones de máx. calidad)	Considerar eDET

Bélgica

Las autoridades sanitarias de Bélgica identificaron la prematuridad asociada a la alta frecuencia de gestaciones múltiples procedentes de FIV como una importante causa de consumo de recursos sanitarios públicos en cuidados intensivos neonatales por lo que diseñaron por tanto una estrategia de control específica.

El gobierno belga aprobó en 2003 una norma en virtud de la cual reembolsa 1.182 euros por ciclo, y actualizables anualmente, hasta seis ciclos a los pacientes que reciben tratamiento en centros públicos o privados autorizados de su elección, siempre que dicho tratamiento se realice en mujeres de hasta 42 años y con arreglo a la siguiente limitación respecto del número de embriones transferibles (Tabla 3):

Tabla 3: Nº de embriones a transferir con la legislación belga (1Junio, 2003).

Edad de la mujer	Número de embriones transferidos		
	1 Ciclo	2 Ciclo	3-6 Ciclos
Menores de 36 años	1	1 ó 2	Máximo 2
Entre 36-39 años	1 ó 2	Máximo 2	Máximo 3
Entre 40-42	Sin límites		

- Mujeres menores de 35 años: un embrión en primer y segundo ciclo (dos embriones en segundo ciclo si no existen embriones de máxima calidad).
- Mujeres de 35-39 años: máximo de dos embriones en primer y segundo ciclo, y máximo de tres en tercero a sexto.
- Mujeres de 40-42 años: sin límite.

La aplicación de esta normativa es obligatoria para obtener la financiación pública de los tratamientos, y se controla mediante un registro de los ciclos, que los profesionales han de comunicar desde su inicio. El control del proceso recae en una comisión técnica de profesionales por delegación de la autoridad sanitaria.

El impacto de este programa ha sido analizado en numerosas publicaciones. Mediante los indicadores de resultado de centros concretos, diversos autores han estimado una reducción del porcentaje de gestación múltiple durante el primer año de aplicación desde rangos previos a la instauración del programa de 19-29% a 8-3% incluyendo las gestaciones monocigóticas (Gordts et al., 2005; de Neubourg et al., 2006; Van Landuyt et al., 2006, Peeraer et al., 2013).

Países escandinavos

En Suecia, Dinamarca, Finlandia, Noruega e Islandia la cobertura sanitaria pública de los tratamientos de reproducción asistida es muy amplia, y asume el reembolso del coste completo del tratamiento realizado en centros públicos, y solo en parte del coste de los tratamientos aplicados en centros privados por elección

del paciente (ESRHE 2009).

Dos de estos países, Suecia y Finlandia, lideraron a partir de finales de la década de los 90 del pasado siglo las iniciativas para la reducción de la incidencia de la gestación múltiple por medio de la transferencia electiva de embrión único (eSET) (Gerris et al., 2000). La propuesta sobre esta actitud como instrumento de control de la gestación múltiple partió y se desarrolló entre los profesionales de los centros públicos y con alto grado de accesibilidad para los tratamientos. Solo tras la consolidación de estas conductas, como el estándar de la práctica clínica, las regulaciones legales de los países de esta área elevaron al rango de norma lo que ya constituía una práctica clínica habitual y protocolizada, y que consiste en transferir como norma un solo embrión y reservar la transferencia de dos embriones para casos de mal pronóstico (Ory et al., 2014). En 2010, Suecia encabezó la tendencia a la transferencia electiva de embrión único, que se realizó en el 73,3% de los ciclos (Kupka et al., 2014).

Alemania

Desde 1990, la legislación alemana prohíbe la transferencia de más de tres embriones en centros públicos y privados. Limita además a dos el número máximo de embriones que pueden ser transferidos a pacientes menores de 38 años (Ory et al., 2014).

Nueva Zelanda

La cartera de servicios en reproducción humana asistida de Nueva Zelanda incluía hasta 2005 un solo ciclo de tratamiento mediante FIV, sin limitar el número máximo de embriones a transferir. Desde 2005, las pacientes que cumpliesen los requisitos establecidos para recibir la transferencia electiva de un embrión y aceptasen voluntariamente la misma, recibían cobertura adicional para un segundo ciclo de FIV en caso de fracaso en el primero. El 90% de las pacientes en las que estaba indicado aceptaron la transferencia electiva de embrión único (Coetzee et al., 2007).

Australia

El comité de Acreditación de Tecnología reproductiva de la Sociedad Australiana de Fertilidad recomienda desde 2008 la realización de transferencia electiva de embrión único en toda paciente con edad inferior a 35 años, y la transferencia máxima de dos embriones en cualquier edad ó circunstancia (Ory et al., 2014).

Las recomendaciones de este comité no tienen carácter normativo, por lo que no resultan de obligado cumplimiento. No obstante, la adhesión a las mismas de los centros públicos ha sido recomendada por las autoridades sanitarias del país, ya que existe un mutuo reconocimiento entre las recomendaciones del Comité y las del *Nacional Health and Medical Research Council* australiano.

Los datos procedentes del registro conjunto de Australia y Nueva Zelanda (ANZARD) muestran una clara tendencia al incremento de la frecuencia de transferencia electiva de un embrión, del 63,7% en 2007 al 73,2% en 2011.

En 2011, las gestaciones múltiples derivadas de reproducción asistida en estos países representaron tan sólo el 6,9%, manteniendo la tasa de gestación por ciclo en torno al 23,0%. (Assited reproductive technology in Australia and Nueva Zelanda, 2011).

Estados Unidos

En el año 2000, la mayoría de las transferencias embrionarias en los Estados Unidos eran de tres o más embriones. El número máximo de embriones a transferir fue publicado por primera vez en 1998 a través de la Sociedad Americana para las Técnicas de Reproducción Asistida (SART) y la Sociedad Americana de medicina reproductiva (ASRM), siendo revisadas periódicamente para mejorar las tasas de implantación (Practice Committe of the SART and Practice Committee of the ASRM, 2004; 2006, 2009).

Gracias al lanzamiento de estas directrices, la frecuencia de las transferencias de tres o más embriones disminuyó de manera constante (Centers for Disease Control and Prevention, 2011).

En un período de 10 años (1999-2008) la proporción de transferencias con tres o más embriones disminuyó del 70% al 39%, donde las transferencias de cuatro o más embriones cayeron del 36% al 14%. Antes del año 2002, sólo el 1% de las transferencias eran eSET; con la evolución de las recomendaciones de las sociedades americanas (SART/ASRM), las tasas de eSET en las pacientes menores de 35 años aumentaron en aproximadamente un 1% -2% cada año desde 2002, que representó aproximadamente el 10% de los todas las transferencias de las pacientes menores de 35 años en 2009, esta tendencia dió lugar a un aumento del número de transferencias de dos embriones (DET), lo que llevó a una reducción en el número de embarazos de alto orden pero sin cambios en las tasas embarazo gemelar.

Recientemente la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) ha publicado en 2013 unas nuevas recomendaciones (Tabla 4), siendo aún pronto para valorar el impacto de estas.

Tabla 4: RECOMENDACIONES DE LA ASRM (Practice Committee of the SART and Practice Committee of the ASRM, 2013).

	<35 años	35-37 años	38-40 años	41-42 años
División temprana				
Favorable	1-2	2	3	5
Todo lo demás	2	3	4	5
Blastocisto				
Favorable	1	2	2	3
Todo lo demás	2	2	3	3

Indicando la eSET en mujeres menores de 35 años, con al menos dos embriones de buena calidad y un exceso de buenos embriones para crioconservar. Por lo tanto, limitando la eSET a casos muchos más reducidos a los indicados en países europeos.

Cánada (región de Québec)

En Cánada, la atención sanitaria es responsabilidad individual de cada provincia, cada una determina la cobertura de dicha asistencia. Los datos publicados en el registro canadiense a partir de 2005, puso en evidencia que América del Norte tiene el mayor problema de nacimientos múltiples en TRA. Así, Cánada y los EE.UU encabezaban las estadísticas con un 30%.

En agosto de 2010, el gobierno provincial de Québec, presentó la financiación de tratamientos de reproducción asistida a través del programa de salud provincial. Junto a este beneficio, se introdujo una legislación para controlar las actividades de los tratamientos de reproducción asistida en la provincia, incluyendo las restricciones sobre el número de embriones que podían transferirse en un ciclo.

En 2009, antes de la introducción del programa, la SET era utilizada en el 1,6% de las transferencias, lo que resultó en una tasa de embarazo múltiple de 25,6%. En los 3 primeros meses de este programa, 1.353 ciclos de fecundación in vitro se llevaron a cabo en cinco centros de reproducción asistida en Québec, con una tasa de embarazo clínico global del 32% por transferencia, siendo el 50% transferencias de un único embrión (SET). La tasa de embarazo múltiple fue sólo del 3,7% (Bissonnette et al., 2011).

Estos datos demuestran que la financiación pública en los tratamientos de reproducción asistida junto con el uso de la SET, no sólo era posible, sino que también se implantó rápidamente. El resultado fue una dramática caída en las tasas de embarazo múltiple (1,6%) (Vélez et al., 2013; Vélez et al., 2014).

Turquía

La normativa turca anterior a 2010 limitaba a tres el número máximo de embriones que podían ser transferidos, aunque en determinadas circunstancias este límite podía ser sobrepasado. En 2010, se promulgó una nueva legislación con objeto de favorecer la transferencia electiva de un solo embrión que obliga a los centros de reproducción a transferir a pacientes menores de 35 años un único

embrión en los dos primeros ciclos, y un máximo de dos embriones a partir del tercer ciclo o en pacientes con edad superior a 35 años, y siempre sin tener en cuenta la calidad embrionaria (Tabla 5).

Tabla 5. Nº de embriones a transferir con la legislación turca.

Edad de la mujer	Número de embriones transferidos		
	1 Ciclo	2 Ciclo	≥3Ciclo
Menores de 35 años	1	1	Máximo 2
Mayores de 35 años	1 ó 2	Máximo 2	Máximo 2

Tras la introducción de esta regulación en marzo de 2006, que ha generado una notable controversia (Urman et al., 2010), se han publicado estudios de series de casos procedentes de centros únicos privados (que realizan tratamientos con y sin financiación pública parcial) que revelan una reducción de la frecuencia de gestación múltiple del 23,1% al 5,3%, sin reducción significativa del porcentaje de gestación clínica por ciclo iniciado (39,9% vs 34,5%) (Kutlu et al., 2011).

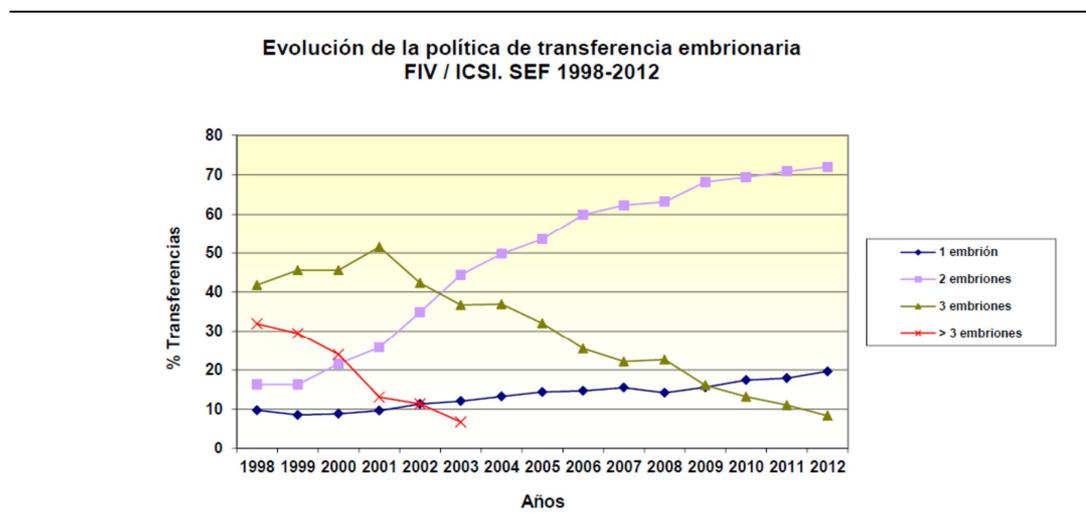
Esta norma se aplica con independencia de la fuente de financiación, en un contexto en el que la cobertura pública a los tratamientos de reproducción asistida ha ido reduciéndose, ya que sólo el 20% de las pacientes con indicación de tratamiento mediante FIV satisface los requerimientos establecidos por el sistema público de salud turco para recibir financiación (Kutlu et al., 2011).

España

En España, la ley de 1988 limitaba el número de embriones a transferir según el criterio del profesional que estaba tratando a una pareja concreta. En el artículo cuarto de la ley 35/1998 se indicaba: “Se transferirán al útero solamente el número de preembriones considerado científicamente como el más adecuado para asegurar razonablemente el embarazo”.

Una de las modificaciones más relevantes introducidas en 2003 en la legislación española en materia de reproducción humana asistida fue la limitación a tres del número máximo de embriones transferibles en un ciclo (ley 45/2003). Actualmente está en vigor la ley 14/2006 (su incumplimiento también está legislado). Este precepto, junto con el progresivo cambio de actitud de los profesionales en relación con la gestación múltiple, está en probable asociación con el progresivo descenso de la media de embriones transferidos y de gestación múltiple que se viene constatando a lo largo de los últimos años (Prados et al., 2014a) (Figura 18).

Figura 18: Evolución de la política de transferencia embrionaria FIV/ICSI. SEF 1998-2012.



EL Grupo de Interés de Salud Embrionaria y Prevención de la Gestación Múltiple de la SEF emitió en 2007 unas recomendaciones sobre la política de transferencia embrionaria adecuada para la prevención de la gestación múltiple derivada de FIV/ICSI (Ricciarelli, 2007b). Estas recomendaciones constituyen la referencia más común en nuestro país a la hora de sustentar las recomendaciones clínicas destinadas a asesorar a los pacientes en la toma de decisiones.

Los datos disponibles sugieren que los centros de reproducción asistida españoles han asumido la transferencia de dos embriones como patrón estándar de conducta, pero muy pocos han incorporado la transferencia electiva de un

único embrión para la reducción del porcentaje de gestaciones múltiples (Prados et al., 2014a).

4.2 Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad

Uno de los grandes retos que se planteó la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) fue la reducción de la tasa de embarazos múltiples y por ello se creó en 2003 el Grupo de Interés “Salud Embrionaria”. Este grupo puso en marcha diversos proyectos cuyo objetivo principal era la reducción de los embarazos múltiples, y el mayor reto fue el de eliminar los embarazos triples y de alto orden, 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 encuesta 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 (Bruna, 2004). De las conclusiones de esta encuesta cabe señalar:

- Se transferían un elevado número de embriones.
- Sólo había un 1% de Transferencias Selectivas de un embrión.
- Las tasas de embarazo múltiple eran 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 utilizaban algoritmos en la decisión del número de embriones a transferir. El 90% de los centros aceptaban la reducción embrionaria, pero la mitad las derivaban hacia otros centros. El seguimiento obstétrico de los embarazos conseguidos tras la aplicación de las TRA lo realizaban 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:

1. Recomendaciones del número de embriones a transferir.
2. Elaboración de un folleto informativo para las pacientes sobre el tema.

3. Unificar los criterios de embrión óptimo

Para la difusión de las recomendaciones entre los Profesionales, éstas fueron publicadas a través de los diferentes órganos de difusión de la SEF.

* Su página WEB: www.nuevo.sefertilidad.com/quienessomos/saludembrionaria.php

* En el boletín informativo SEF (2005, numero 1)

* En el congreso de la SEF de 2004 celebrado en La Coruña, donde tuvo lugar la presentación oficial de dichas recomendaciones.

* Posteriormente también se organizó un symposium donde participaron destacados expertos de nuestro ámbito: www.editorialmedica.com/archivos/fertilidad/Fert-Sept-Oct05-Trabajo1.pdf.

- De igual modo, las recomendaciones fueron publicadas en diferentes revistas científicas (Tur et al., 2005; Tur et al., 2006).

Por otra parte, para la difusión de las recomendaciones entre pacientes se elaboró un folleto informativo destinado a ellos. Según el modelo de la toma de decisiones compartida, el encuentro clínico es un momento único donde el médico ayuda al paciente en la elección del tratamiento más apropiado para su problema de salud y condición. El médico se considera el experto del conocimiento clínico y el paciente el experto del conocimiento de los factores contextuales de su propia situación. El folleto informativo para pacientes se publicó en la página WEB de la SEF y se realizaron 10.000 copias que se distribuyeron entre todos los centros de reproducción asistida registrados por la SEF. Esta información está disponible a través del siguiente enlace: www.nuevo.sefertilidad.com/quienessomos/saludembrionaria/folletoinformativo.pdf.

Las recomendaciones de consenso del número de embriones a transferir en FIV se elaboraron teniendo en cuenta parámetros tales como: la edad de la mujer, el número de embriones de buena calidad disponibles en el momento de la transferencia y el número de ciclos FIV previos realizados. Dichas recomendaciones 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).

Tabla 6. Guía de Recomendaciones sobre el número de embriones a transferir en España.

Edad de la mujer	Nº de embriones a transferir	Excepciones
Menores de 30 años	1 ó 2	- Ninguna
Entre 30-37 años	1 ó 2	- A partir del tercer ciclo valorar la transferencia de 3 embriones, si no hay ninguno que cumpla los requisitos de "embrión de buena calidad"
Mayores de 38 años	2	- A partir del primer ciclo: valorar la transferencia de 3 embriones, si no hay ninguno que cumpla los requisitos de "embrión de buena calidad"
Donación de ovocitos	1 ó 2	- Ninguna

Cabello et al (2010), analizaron el impacto en la política de transferencia embrionaria que tuvieron la limitación legislativa de no transferir más de tres embriones del año 2003 y la publicación de las comentadas recomendaciones de la SEF en 2004. Estos autores concluyeron que con la limitación legislativa disminuían los embarazos gemelares y triples, mientras que con las Recomendaciones de la SEF, disminuyeron principalmente los embarazos triples.

A pesar de estas estrategias, la tasa de embarazo gemelar en España ha seguido siendo superior que en el resto de la media europea (19,4%) (Kupka et al., 2014).

4.4 Financiación de la Reproducción Asistida y gestación múltiple. Contexto Internacional y español.

La financiación de los tratamientos de reproducción asistida con cargo a los presupuestos de los sistemas nacionales de salud constituye uno de los elementos fundamentales de los que depende la accesibilidad de los tratamientos. En un contexto de financiación pública, los pacientes no asumen de forma directa el coste de los tratamientos, y los profesionales implicados pertenecen habitualmente a entidades sin ánimo de lucro. Estas dos circunstancias pueden permitir conjugar estrategias orientadas a la búsqueda de eficacia y seguridad en las TRA.

Hace ya una década en EEUU, varios autores señalaron la existencia de diferencias en la efectividad clínica y la seguridad; evaluada por la frecuencia de gestación gemelar y múltiple de alto orden, en función del carácter obligatorio o voluntario de la financiación de los tratamientos de reproducción asistida a través de pólizas de seguro privado (Guzick DS. 2002; Jain et al., 2002; Henne and Bundorf, 2008). La conclusión de estos estudios fue que la financiación de los tratamientos por medio de póliza de seguro asistencial privado se asociaba a una disminución de la probabilidad de gestación, pero también a una reducción de la incidencia de gestación múltiple.

Estos resultados fueron confirmados posteriormente por dos estudios que analizaban la cobertura sanitaria en las TRA en diferentes países (Navarro et al., 2008; Vélez et al., 2014). Ambos estudios, observaron una menor tasa de embarazos múltiples en países con algún tipo de cobertura pública de las TRA. Asociando dicha disminución a un menor número de embriones transferidos en países con cobertura pública de las TRA.

En nuestro país, Castilla et al. (2009), utilizando datos del Registro de la Sociedad Española de Fertilidad del periodo 2002-2004 demostró que los centros de titularidad pública presentaba en ciclos con ovocitos propios una menor tasa de

gestación por transferencia que los centros privados, pero también una significativa menor tasa de embarazo múltiples (23,4% vs 26,4%).

5. Transferencia electiva de embrión único: eSET

Como hemos visto en la sección 4.1, la transferencia de embrión único es una política en auge actualmente, sobre todo debido a la necesidad de disminuir el número de embarazos múltiples (Roberts et al, 2009), los cuales de forma natural tienen una prevalencia del 1% mientras que en los embarazos obtenidos mediante técnicas de reproducción asistida, los embarazos múltiples pueden llegar al 20-30%.

La transferencia de embrión único (SET) se puede dividir en tres categorías:

- SET por indicación médica: Se considera en mujeres a las que un embarazo múltiple supondría un riesgo mayor que para la población general (Ej: riesgo de enfermedades cardiovasculares en mujeres con Síndrome de Turner).
- SET electiva: Se selecciona entre 2 ó más embriones, el más adecuado para la implantación.
- SET obligatoria: Cuando sólo hay un embrión disponible. Normalmente cuando sólo hay un embrión, este es de peor calidad lo que significa bajas tasas de implantación. Sin embargo, si la calidad del embrión es óptima las tasas de embarazo son comparables a las obtenidas con SET electivo (Straughen et al, 2013).

En la década pasada y gracias al trabajo pionero de los grupos escandinavos, ha quedado demostrada la utilidad de la transferencia electiva de un único embrión (eSET), sobre todo en pacientes jóvenes con buen pronóstico, en la reducción del embarazo gemelar sin comprometer la tasa de embarazo (Gerris et al., 1999; Martikainen et al, 2001; Thurin et al, 2004; Lukassen et al, 2005; van Montfoort et al, 2006).

Los estudios que evalúan los resultados obstétricos y perinatales obtenidos al aplicar eSET frente a los conseguidos con transferencia embrionaria de dos

embriones (DET) muestran claramente que al reducir la tasa de embarazo múltiple mejoran significativamente dichos parámetros obstétricos y perinatales (Sullivan et al., 2012).

5.1 Eficacia de eSET versus DET

En los últimos años se han publicados diferentes metanálisis con el objetivo de evaluar la eficacia y seguridad de las diferentes políticas de transferencia embrionaria en las parejas que se someten a TRA (Gelbaya et al., 2010; McLernon et al., 2010; Pandian et al., 2013).

5.1.1 Estudios prospectivos aleatorizados

Varios ensayos clínicos aleatorizados han comparado las tasas gestación clínica y de nacido vivo entre la estrategia eSET frente a DET (Gerris et al., 1999; Martikainen et al., 2001; Thurin et al., 2004; Gardner et al., 2004; Lukanssen et al., 2005; van Moontfort et al., 2006; Moustafa et al., 2008; Prados et al., 2014b).

El estudio más grande y mejor diseñado entre estos ensayos es un estudio multicéntrico, doble ciego, entre 11 clínicas en Suecia que asignaron al azar 661 pacientes en eSET o DET (Thurin et al., 2004). Los requisitos de inclusión fueron: edad <36 años, primer o segundo ciclo de FIV, y al menos dos embriones de buena calidad. Las pacientes del grupo eSET que no quedaron embarazadas en la transferencia en fresco se sometían a una posterior criotransferencia de embrión único. La tasa de nacido vivo fue significativamente menor después de la eSET frente a DET (28% vs 43%, respectivamente). Sin embargo, después de tener en cuenta el ciclo de criotransferencia, la tasa de nacido vivo acumulada no fue estadísticamente diferente entre los dos grupos de tratamiento (39% vs 43%, respectivamente).

Con la última revisión sistemática de Pandian et al. (2013), se pone en evidencia que si comparamos la eSET más criotransferencia de embrión único frente a DET, se pueden conseguir tasas de gestación acumulada prácticamente iguales y tasas de nacido vivo similares; sin embargo, estos estudios se aplican a mujeres jóvenes y siempre disponiendo de embriones de buena calidad. Por lo tanto este metanálisis concluye sugiriendo que se tienen que realizar más ensayos clínicos

aleatorizados en mujeres mayores de buen pronóstico y siendo menos restrictivo en la calidad embrionaria.

Entre los diferentes estudios aleatorizados, aproximadamente el 30% de todos los embarazos fueron gemelares en el grupo DET, mientras que sólo el 1% -2% de eSET fueron múltiples, derivados de gemelos monocigóticos (Thurin et al., 2004; Lukassen et al 2005; Moustafa et al., 2008; Gerris et al., 1999; Martikainen et al., 2001; van Montfoort et al., 2006; Pandian et al., 2009; Gelbaya et al., 2010; McLernon et al., 2010) (Tabla 7).

Tabla 7. Estudios prospectivos aleatorizados de eSET vs DET.

Estudio	Detalles	Nºpacientes/ Duración/ Centros	Intervenciones	SET PR%	SET Gemelos%	DET PR%	DET Gemelos%
Gerris et al., 1999	Aleatorización en la TE (día 3). Primer IVF/ICSI. Edad de la mujer < 34. Al menos un embrión de buena calidad.	53 / 2 años/1 centro	SET fresco v DET fresco	38,5	1/10	74,0	30,0
Martikainen et al., 2001	Aleatorización en la TE (día 2). Primer IVF/ICSI. Edad de la mujer <35. Al menos cuatro embriones de buena calidad.	144/ 4 centros	SET fresco + FET v DET fresco+ FET	32,4 (47,3)	1/24 1/37	47,1 (58,6)	18,2
Thurin et al., 2004	Aleatorización en la TE (día 2,3 ó 5). Primer o segundo IVF/ICSI. Edad de la mujer <36. Al menos dos embriones de buena calidad.	660/ 3 años/ 11 centros	SET fresco+SET criote v DET fresco	34,9 (47,2)	1/91 1/119	52,9	33,1
Gardner et al., 2004	Aleatorización en la TE (día 5) Edad de la mujer < 35. Día FSH <10mUI/ml. Al menos 10 folículos >12mm.	48/2 años/1 centro	SET fresco v DET fresco	60,4	0/14	76	47,4
Lukassen et al., 2005	Aleatorización en la TE (día 3). Primer IVF/ICSI. Edad de la mujer < 35. Al menos un embrión de buena calidad. FSH basal < 10IU.	107/ 2 años/ 2 centros	2SET fresco v DET fresco	37,0 (56,0)	0	47,0	37,0
van Montfoort et al., 2006	Aleatorización en la TE (día 2 ó 3). Primer IVF/ICSI. Compara dos grupos de pacientes. < 38años y al menos un embrión de buena calidad frente a parejas no seleccionadas (independiente de la edad y embriones de buena calidad).	308 parejas no seleccionadas y 222 parejas seleccionadas/ 4 años/ 2 centros	SET fresco v DET fresco	21,0 33,0	0 3,0	40,3 30,3	21,0 26,2
Moustafa et al., 2008*	Estudio prospectivo quasi aleatorizado. Edad de la mujer <30 años. Al menos un embrión de buena calidad.	81/1 años/ 1 centro	SET fresco+multipleSETcriote v DET fresco+múltipleDET criote	32,5 (37,4)	0	39,0 (42,1)	14,0
Prados et al., 2014b**	Aleatorización en la TE (día 3 ó 5). Edad de la mujer <38 años. Al menos cuatro embriones de buena calidad.	199/1año/1centro	SET fresco+SETcriote v DET fresco	42,0 (63,0)	0	65,0	35,0

TE (Transferencia embrionaria); SET (Transferencia de un embrión); DET (Transferencia de dos embriones); PR% Proporción de embarazo clínico; Gemelos% Proporción de embarazo múltiple. Entre paréntesis se muestra la tasa acumulada. * Quasi-aleatorizado: se utilizaron los días alternos como método de aleatorización.** En este estudio el 40% de las pacientes después de la aleatorización se cambiaron al grupo DET.

5.1.2 Estudios no aleatorizados: retrospectivos y prospectivos

Además de los ensayos aleatorizados descritos anteriormente, varios estudios no aleatorizados proporcionan resultados de las comparaciones entre eSET y DET.

En conjunto, estas comparaciones no aleatorizadas de eSET contra DET son compatibles y refuerzan las conclusiones de los RCTs (Gerris et al., 2002 Criniti et al., 2005; Henman et al., 2005; Stillman et al., 2009; le Lannou et al., 2006; Veleva et al., 2006; Gremau et al., 2012; Rodriguez et al., 2012; Niimaki et al., 2013).

Cinco de los ensayos no aleatorizados compararon tasa de gestación acumulada teniendo en cuenta tanto las transferencias de embriones en fresco como las posteriores criotransferencias (FET). Las criotransferencias, sin embargo, eran una combinación de transferencias individuales y transferencias de dos embriones, más comúnmente la última. En los cinco estudios, los resultados de gestación clínica acumulada fueron casi idénticos para el eSET+FET y el grupo de tratamiento de dos embriones DET+FET: 43,0% vs 45,0% (le Lannou et al., 2006), 65,3% vs 64,2% (Henman et al., 2005), y 66,2% vs 69,7% PR acumulada (Rodríguez et al., 2012).

Así, tanto los RCTs y estos estudios no aleatorizados bien controlados demuestran de forma consistente que cuando se tienen en cuenta las posteriores criotransferencias, la tasa de gestación acumulada por punción es similar entre eSET y DET (Tabla 8).

Tabla 8. Estudios no aleatorizados prospectivos y retrospectivos de eSET vs DET.

Estudio	Detalles	Nºpacientes/ Duración/ Centros	Intervenciones	SET PR%	SET Gemelos%	DET PR%	DET Gemelos%
Gerris et al., 2002	Análisis retrospectivo. TE en día 3. Media de edad de la mujer 32 años. Siempre embriones de buena calidad	eSET=299; DET=853/ 4 años(1998-2001)/ 1 centro	eSET vs DET	35,1	1,0	50,0	40,0
Criniti et al., 2005	Análisis retrospectivo. TE en día 5. Media de edad de la mujer 32 años. Blastocistos de buena calidad.	eSET=41; DET=66/ 18 meses (Enero 2003- Agosto 2004)/ 1 centro.	eSET vs DET	76,0	3,2	79	62
Henman et al., 2005	Prospectivo no aleatorizado. TE en día 5. Edad de la mujer < 38 años. Buenas respondedoras y ciclos de ovodonación.	eSET=121; DET=285/ 4 años (20-2004)/ 1 centro privado.	eSET+FET vs DET+FET	45,0 (65,3)	2,0	57,0 (64,2)	44,0 (34,0)
Stillman et al., 2009	Análisis retrospectivo. TE en día 5. Edad de la mujer < 35 años. Buenas respondedoras y ciclos de ovodonación. Al menos dos Blastocistos de buena calidad.	eSET=583; DET=3300 /6 años (2002-2007)/ 1 centro privado.	eSET vs DET	65,0	1,0	63,0	44,0
le Lannou et al., 2006	Estudio prospectivo no randomizado. Edad de la mujer < 38 años. Al menos dos embriones de buena calidad.	eSET=130; DET=130/ 2 años (2002-2004)/ 1 centro.	eSET+FET vs DET+FET	27,6 (43,0)	0	36,9 (45,0)	34,0
Veleva et al., 2006	Análisis retrospectivo. TE en día 2 ó 3. Edad de la mujer 36-39 años. Al menos un embrión de buena calidad.	eSET=335; DET=585/ 3 años (2000-2003)/ 2 centros	eSET+FET vs DET+FET	33,1 (54,0)	0 (1,7)	29,9 (35,0)	17,7 (16,6)
Rodríguez et al., 2012	Estudio prospectivo observacional. Edad de la mujer < 35 años. Embriones de buena calidad.	eSET=326; DET=302/ 4 años (2002-2006)/ 1 centro privado	eSET+DFETvs DET+DFET	46,6 (66,2)	0,7 (7,2)	38,3 (69,7)	26,4 (26,6)
Gremau et al., 2012	Análisis retrospectivo. TE en día 2. Edad de la mujer <36 años. Al menos dos embriones de buena calidad. Primer ó segundo ciclo de FIV/ICSI.	eSET=442/DET=341/ 3 años (2005-2008)/ 1 centro	eSET+eSFET vs DET+DFET	29,9 (40,7)	0,0 (0,7)	39,1 (42,5)	22,0 (21,2)
Niinimaki et al., 2013	Estudio retrospectivo. TE en día 2 ó 3. Edad de la mujer 40-44 años. Al menos dos embriones de buena calidad.	eSET=264; DET=364/ 9 años (2000-2009)/ 1 centro	eSET+DFETvs DET+DFET	23,5 (37,1)	0 (6,7)	19,5 (24,2)	7,5 (8,3)

TE (Transferencia embrionaria); SET (Transferencia de un embrión); DET (Transferencia de dos embriones); PR% Tasa de embarazo clínico; Gemelos% Tasa de embarazo múltiple. Entre paréntesis se muestra la tasa acumulada.

5.1.3 Experiencias clínicas

Numerosos estudios con controles históricos sobre la utilización de la eSET han confirmado la reducción de la tasa de embarazo múltiple y el mantenimiento de la tasa de embarazo global y de recién nacido. Un estudio evaluó la adopción voluntaria de eSET durante un período de 6 años (de Sutter et al., 2003). Se recomendaba en dicho estudio, la transferencia de un embrión a las pacientes menores de 37 años, sometidas a su primer o segundo ciclo de FIV y con al menos dos embriones de buena calidad. En este estudio se compararon los resultados del tratamiento entre 1997-1998 (cuando el 1,5% de todas las transferencias fueron eSET) y 1999-2002 (cuando el 17% de todas las transferencias fueron eSET). A pesar del aumento en el uso de eSET, tanto la tasa de implantación (18% vs 18%), como la tasa de gestación (32% vs 31%) no fueron estadísticamente diferente entre estos dos períodos de tiempo, mientras que la tasa de embarazo múltiple se redujo significativamente de un 31% al 23%. Varios estudios posteriores han reproducido estos resultados (Gordts et al., 2005; van Landuyt et al., 2006; Ryan et al., 2007; Khalaf et al., 2008; Kutlu et al., 2011., Debrock et al., 2005; Vélez et al., 2013) (tabla 9).

Tabla 9. Experiencias clínicas de eSET vs DET.

Estudio	Detalles	PERÍODOS	PERÍODO eSET		PERÍODO DET	
			PR%	Gemelos%	PR%	Gemelos%
De Sutter et al., 2003	Análisis retrospectivo. TE en día 2 ó 3. Edad de la mujer < 37 años. Al menos dos embriones de buena calidad.	1997-1998: DET período (uso de la eSET: 1,7%). 1999-2002: eSET período (uso de la eSET: 17%)	31,0	21,0	32,0	30,0
Gordts et al., 2005	Implantación de la legislación belga en 2003. Análisis retrospectivo. TE en día 2 ó día 3. Edad de la mujer <42 años. Embriones de buena calidad.	2002: DET periodo (uso de la eSET: 14%). 2003: eSET periodo (uso de la eSET del 49%).	37,0	3,0	36,0	19,0
Debrock et al., 2005	Implantación de la legislación belga en 2003. Análisis retrospectivo. TE en día 3 ó día 5. Edad de la mujer <43 años. Embriones de buena calidad.	2002: DET período (uso de la eSET: 15%). 2003: eSET período (uso de la eSET del 50%)	32,5	7,0	37,5	25,9
Veleva et al., 2009	Análisis retrospectivo. TE en día 2 ó 3. Edad de la mujer < 40 años. Al menos un embrión de buena calidad	1995-1999: DET periodo (uso de la eSET: 4,2%). 2000-2003: eSET período (uso del 46,2%).	25,9 (38,2)	7,9 (8,7)	26,4 (33,1)	22,5 (18,7)
Van Landuyt et al., 2006	Análisis retrospectivo. Implantación de la legislación belga 2003. TE en día 3 ó 5. Media de edad de la mujer 33 años. Embriones de buena calidad.	2002-2003: DET periodo (uso de la eSET:15%). eSET período (uso del 55%)	27,4	9,5	30,7	29,1
Velez et al., 2013	Análisis retrospectivo. Financiación de las TRA. TE en día 3 ó día 5. Edad <42. Embriones de buena calidad.	2009:DET período (uso de la eSET: 17,3%). 2010-2011: eSET período (uso de la eSET: 85,0%)	23,2 (29,7)	2,9	31,9	25,8
Kutlu et al., 2011	Implantación de la legislación turca en 2010. Análisis retrospectivo. TE en día 2, día 3 ó 5. Edad <35. Embriones de buena calidad.	2009: DET periodo (uso de la eSET:ND)2010: eSET período (uso de la eSET:50%)	34,5	5,3	39,9	23,1

TE (Transferencia embrionaria); SET (Transferencia de un embrión); DET (Transferencia de dos embriones); PR% Tasa de embarazo clínico; Gemelos% Tasa de embarazo múltiple. Entre paréntesis se muestra la tasa acumulada. ND: no datos.

5.1.4 Coste-efectividad de la estrategia eSET vs DET

Tradicionalmente, las decisiones clínicas se han basado en los resultados de eficacia de los ensayos clínicos. En la actualidad y de una forma creciente, los profesionales de la salud utilizan otras técnicas, principalmente las evaluaciones económicas, para completar y mejorar el complicado proceso de toma de decisiones dentro del sistema sanitario.

Por otro lado, el análisis de coste-efectividad (ACE) es la técnica de evaluación más utilizada para la comparación de distintas estrategias alternativas de intervención terapéutica y se encuentran entre los criterios requeridos por la NICE (National Institute for Clinical Excellence) para recomendar un tratamiento. El ACE es una técnica de evaluación económica que trata de comparar el coste y el efecto clínico de 2 o más intervenciones alternativas, potencialmente competidoras y, en general, mutuamente excluyentes, para determinar cuál de ellas es mejor desde un punto de vista económico y clínico.

La técnica de evaluación económica elegida depende de la naturaleza de los beneficios que se van a estudiar. En el caso del ACE, los beneficios se expresan en términos no monetarios relacionados con los efectos de las alternativas terapéuticas en la salud, y pueden ser expresados como el porcentaje de curación, el porcentaje de pacientes que alcanza un determinado objetivo terapéutico, los años de vida ganados, etc., mientras que en un análisis coste-utilidad o en un análisis coste-beneficio dichos beneficios se expresan, respectivamente, en años de vida saludable ganados u otras utilidades y beneficios monetarios.

Por todo esto, con el objeto de aumentar la evidencia respecto si la transferencia de embrión único equilibra el riesgo de disminuir las tasas de nacidos vivos con la disminución de la tasa de embarazos múltiples, y además, a un menor coste, el número de estudios de coste-efectividad se ha incrementado en los últimos años. (tabla 10).

A pesar de la gran variabilidad en los diseños de estos estudios en general podemos concluir que el eSET+FET es más coste-efectiva que el DET (Fiddellers et al., 2007).

Tabla 10. Estudios coste efectividad de la estrategia eSET vs DET

Estudio	Detalles del estudio	Estrategia/ Nº pacientes/ciclo	Medida de resultado	Componentes costes	Conclusiones
Wolner-Hanssen et al., 1998	Serie de casos, Unicentro. Perspectiva del análisis: Gobierno, financiador del análisis.	Ciclos FIV: SET (resultados hipotéticos) vs DET (resultados reales).	Tasa de implantación, tasa de nacidos vivos, tasa de embarazo gemelar.	Métodos directos (FIV)	SET es más rentable que DET, incluso con tasas de nacidos vivos más bajas para SET. La razón es la menor tasa general de SET.
De Sutter et al., 2002	Modelo analítico de decisión (Modelo de Markov). Mujeres con "buen pronóstico".	Ciclos FIV/ICSI: SET vs DET/ SET=1000; DET=1000 (simulaciones)	Tasa de nacido vivo.	Métodos directos (FIV, embarazo, complicaciones: días de estancia en UCIN)	SET es más efectivo que DET
Gerris et al., 2004	Estudio observacional prospectivo. Mujeres <38 años. Perspectiva del sistema sanitario.	eSET vs DET/ SET (n=206) y DET (n=161)/ Un máximo de un ciclo fresco.	Tasa de nacido vivo.	Métodos directos (FIV, embarazo, cuidados postnatales hasta los 3 meses).	eSET es igualmente eficaz, pero sustancialmente más barato que DET en mujeres <38 años en su primer ciclo de FIV/ICSI.
Lukassen et al., 2005	Ensayo clínico aleatorizado, unicéntrico. Mujeres <35 años. Perspectiva del sistema sanitario.	Ciclos de FIV/ICSI: eSET (+eSET, si no éxito) vs DET. SET (n=54) y DET (n=53)/ Un máximo de dos ciclos frescos si eSET, o uno si DET.	Resultado primario: Tasa acumulada de embarazo. Resultado secundario: Tasa de embarazo tras un ciclo, embarazo múltiple, ectópicos, aborto espontáneo.	Métodos directos hasta 6 semanas después (coste FIV y cuidados hasta 6 semanas después).	DET y SET son igualmente costo-efectivas. Sin embargo, el SET se prefiere sobre el DET en mujeres de riesgo.
Fiddlers et al., 2006	Ensayo clínico aleatorizado. Mujeres < 38 o =>38 años. Perspectiva social.	Ciclos de FIV: eSET vs DET. SET (n=154) y DET (n=154) Un máximo de un ciclo fresco.	Tasa de nacido vivo.	Métodos directos (hospitalarios (personal, materiales, equipos, medicamentos y gastos generales) FIV, embarazo) e indirectos (productividad, gastos de viaje, exceso de medicamentos de venta libre). Hasta 4 semanas después del parto.	Un ciclo eSET es más barato, pero también menos eficaz en comparación con DET. Depende de la "voluntad de la sociedad" para pagar por un embarazo exitoso extra.
Kjellberg et al., 2006	Ensayo clínico aleatorizado, multicéntrico (11 clínicas públicas y privadas, de tres países). Mujeres <36 años. Perspectiva del sistema sanitario y social. Horizonte temporal 6 meses.	Ciclos de FIV: eSET (+fSET, si no éxito) vs DET. SET (n=330) y DET (n=331).	Tasa de nacidos vivos, calidad de vida de las madres a los 6 meses, resultados adversos (complicaciones obstétricas: nacimientos prematuros, RPM, hemorragia, cesárea; y neonatales).	Costes directos (FIV, complicaciones obstétricas/GDR, y neonatales: UCIN) y costes indirectos (productividad)	La transferencia de SET fue más costo-efectiva que la de DET, ya que SET dio lugar a menor complicaciones maternas y pediátricas, y por tanto, menos costos totales.
Polinder et al., 2008	Estudio prospectivo aleatorizado (no inferioridad). Menores de 38 años, ciclos (25-35 días), IMC: 18-28kg/m2. Perspectiva social. Horizonte temporal 1 año.	Estimulación suave/SET vs Estimulación estándar/DET/ Suave/SET=205; Estándar/DET=199/ 4 ciclos, para Suave/SET; 3 ciclos, para Estándar/DET	Tasa de nacido vivo acumulada.	Costes directos e indirectos (durante un año). Costos unitarios.	A pesar de un aumento del número de ciclos en un año, desde un punto de vista económico, la estrategia de estimulación suave es más ventajosa por nacido vivo.

Tabla 10. Estudios coste efectividad de la estrategia eSET vs DET (Continuación)

Dixon et al., 2008	Estudio observacional, multicéntrico. Mujeres de tres grupos de edad (<30, 30-35, 36-39) de 5 centros de FIV. Perspectiva del sistema sanitario. Horizonte temporal 5 años.	eSET (+fSET, si no éxito) vs DET/ ND	Tasa de nacidos vivos, tasas de resultados adversos (nacimientos múltiples, nacimientos prematuros, ingresos en UCIN y estancia, parálisis cerebral), ICER	Costes directos (FIV, cuidados maternos, cuidados pediátricos)	Los autores no llegan a una conclusión definitiva. El coste-efectividad depende de la edad, relevancia de la opción de SET, valor que la sociedad otorga a un nacido vivo, y del impacto de los resultados adversos.
Fiddlers et al., 2009	Modelo analítico de decisión (Modelo de Markov). Distingue entre: Mujeres >38 años / Todas las pacientes. Perspectiva del sistema sanitario y social. Un máximo de 3 ciclos es lo que se define en este estudio como tiempo horizonte.	Ciclos FIV (7 estrategias): 1 eSET + 2 STP; 1 eSET + 2 DET; 1 eSET + 1 STP + 1 DET y 1 STP + 2DET. /ND	Tasa de nacido vivo.	Métodos directos (FIV, embarazo único o múltiple, cuidados hasta 6 semanas después del parto tanto para la madre como para el hijo).	La combinación de varias políticas de transferencia no era rentable. Depende de la voluntad de la sociedad (de lo que esté dispuesta a pagar)
Veleva et al., 2009	Estudio observacional retrospectivo (se evaluaron dos periodos: el periodo DET, 1995-2000; y el periodo SET: 2000-2005). Mujeres <40 años. Perspectiva del sistema sanitario. Tiempo horizonte 10 años.	eSET (+eSET+FET, si no éxito) vs DET/ SET period=684 ; DET period=826. Un máximo de tres ciclos frescos si SET, o uno si DET.	Tasas acumuladas de embarazo, de nacidos vivos, de nacidos a término (se consideró medida de resultado clínica principal), de nacidos múltiples.	Métodos directos (costos de medicamentos y FIV/ICSI). Costes unitarios.	SET es más efectiva (la incidencia de embarazo múltiple se reduce x2) y menos costosa que DET, por lo que se recomienda que se adapte a la práctica habitual. Además, los costes se reducen si se incluyen ciclos de FET.
Scotland et al., 2011	Modelo de microsimulación (3 centros de Escocia). Mujeres de 32, 36 y 39 años. Perspectiva del sistema sanitario y social. Tiempo horizonte 20 años. (coste efectividad y coste utilidad).	eSET(+fSET, si no éxito) vs DET/ Un máximo de tres ciclos (el primero, frescos, los siguientes, congelados-descongelados, para ambas estrategias	Nacidos vivos sin discapacidad; tasa de embarazo gemelar; los años de vida ajustados por la calidad de las mujeres (AVAC); costos de los servicios de salud.	Métodos directos (FIV, embarazo, complicaciones de embarazo)	SET es más rentable en mujeres de 36 años o más jóvenes. El coste-efectividad de DET mejora con la edad, donde se considera rentable. Para las mujeres de 37 a 39 años, debería considerarse caso por caso.

ND: no datos; ICER: relación del coste-efectividad incremental. UCIN: Unidad de cuidados intensivos.

5.2. Indicación para la eSET

Según los estudios publicados, la eSET es más beneficiosa cuando se aplica de forma selectiva de acuerdo con las características del paciente y la calidad del embrión. Generalmente se debe indicar en pacientes con un buen pronóstico: edad <35 años, más de un embrión de alta calidad disponible para la transferencia, especialmente en estadio de blastocistos, primero o segundo ciclo de tratamiento, y receptoras de embriones a partir de óvulos donados (Galbaya et al., 2010; Mc Leron et al., 2010; Pandian et al., 2013; Criniti et al., 2005; Stillmman et al., 2009; Clua et al., 2012). Comentamos algunas de estas indicaciones.

5.2.1 Estadio y calidad embrionaria

Diferentes estudios afirman que la eSET es más aplicable en las transferencias de blastocisto, debido a que estos tienen una mayor tasa de implantación que los embriones en D+2 ó D+3 (Papanikolau et al., 2006; Blake et al., 2007; Zech et al., 2007). De hecho, existen estudios con tasas de gestación múltiple cerca al 50% (Gadner et al., 2004; Balaban et al., 2006) y por encima del 60% (Criniti et al., 2005; Gadner et al., 2000) tras transferencias de dos blastocistos de buena calidad.

Sin embargo, incluso los embriones transferidos en etapas de división temprana, si morfológicamente en D+3 son de buena calidad (con 7 u 8 células, sin multinucleación, y mínima fragmentación), pueden tener tasas de implantación del 50% o más (van Royen et al., 1999; Dennis et al., 2006). Por lo tanto, transferencias de dos embriones de buena calidad pone a los pacientes en alto riesgo de gestación múltiple.

Se han descrito tasas de gestación triple del 2 - 5% en transferencias de dos embriones en estadios tempranos ó blastocistos (Gerris at al., 2002; Stillman et al., 2009), lo que demuestra que con la transferencia de dos embriones de buena calidad también hay un riesgo pequeño pero significativo de gestación de alto orden.

5.2.2 Edad de la paciente (ovocitos propios)

El riesgo de embarazo múltiple entre las mujeres que utilizan sus propios ovocitos disminuye con la edad, pero sigue siendo alto para las mujeres hasta la edad de 40 años.

Hay dos análisis retrospectivos (Veleva et al., 2006; Niinimaki et al., 2013) que analizan la estrategia eSET vs DET en mujeres mayores. Veleva et al. (2006) observó que pacientes de entre 36-39 años pueden alcanzar una tasa de embarazo múltiple del 17,7% con la transferencia de dos embriones. Niinimaki et al. 2013 aplicó eSET a mujeres con una media de edad de 42 años, obteniendo resultados similares de tasa de embarazo acumulada de eSET vs DET; en el grupo DET la tasa de embarazo múltiple acumulado llegó al 8,3% en este tipo de pacientes, incluso llegando a alcanzar el 6,7% en el grupo eSET ya que las criotransferencias eran de dos embriones.

Las tasa de parto múltiple en transferencias de dos embriones en pacientes <35 años, 35-37 años y 38-40 años fueron 40%, 33% y 28%, respectivamente, cuando tuvieron embriones criopreservados (Wright et al., 2008).

Aunque la probabilidad de gestación múltiple se reduce en las pacientes mayores, los riesgos asociados del embarazo múltiple aumentan con la edad. Aunque estos pacientes son mucho menos propensos a obtener embriones capaces de desarrollarse en blastocistos de alta calidad *in vitro*, los que lo hacen pueden lograr tasas de implantación y tasas de gestación similares a los de pacientes más jóvenes (Shapiro et al., 2002). Tasas de gestación viables de más del 50% se han obtenido en las transferencias de un solo blastocisto en pacientes entre 36-42 años (Davis et al., 2008) y 38-40 años (Stillman et al., 2009).

5.2.3 Donación de ovocitos

Las pacientes que utilizan ovocitos de donante tienen mejor pronóstico y se encuentran en mayor riesgo de embarazo múltiple. Tasas de gestación cercanas al 40% o más son típicas para las transferencias de embriones derivados de ovocitos donados (Stillman et al., 2009; Wright et al., 2005; Atlanta: Centers for Disease

Control and Prevention., 2011; Kupka et al., 2014). Con la transferencia de dos embriones en D+3 obtenidos de ovocitos de donantes, se puede esperar una tasa de gestación múltiple aproximadamente del 40% (Adashi et al., 2003), además el embarazo gemelar puede ser mayor del 50% con la transferencia de dos embriones en estadio de blastocisto (Stillman et al., 2009).

5.2.4 Criotransferencia

En cuanto a la eSET en criotransferencia, debe tenerse en cuenta que aunque los riesgos de embarazo múltiple se reducen con la transferencia de embriones criopreservados, sin embargo, sigue siendo significativa (Wright et al., 2008).

Las decisiones sobre la transferencia de embrión único en programas de criopreservación de embriones deben tener en cuenta el pronóstico, la calidad del embrión y las tasas de éxito del programa de criopreservación (Cobo et al., 2012; Zhang et al., 2012; Wang et al., 2012). En el estudio de Cobo et al. 2012, se observó una tasa de implantación en embriones vitrificados similares a las tasa de implantación con embriones en fresco.

5.3. Implantación de la eSET

En nuestro entorno, al igual que en otros sistemas sanitarios públicos de otros países, es difícil implantar la política de eSET.

Las dificultades son ya conocidas: la creencia de que se puede ver comprometida la tasa de embarazo, la presión por la limitación en el número de ciclos en los centros públicos y la percepción positiva de la pareja sobre el embarazo múltiple, que con un solo ciclo puede conseguir el número definitivo de hijos (Hojgaard et al., 2007).

Otro factor muy importante a tener en cuenta es que las preferencias de las pacientes por un embrión ó dos no son estables durante el tratamiento. Según Fiddlers et al. (2011) las pacientes que reciben eSET y quedan embarazadas siguen prefiriendo eSET, mientras que las que no quedan embarazadas con eSET prefieren DET en el siguiente ciclo.

Por lo tanto, existen retos para un mayor uso de la eSET. Estos incluyen la educación de los profesionales y pacientes, consideraciones económicas, la selección de embriones y una criopreservación exitosa.

5.3.1 Educación en el profesional

En el apartado 4 de esta introducción comentamos la importancia de las recomendaciones de sociedades científicas en la implantación del SET, sin embargo una gran dificultad en la promoción de la eSET es la forma en que tienen los centros de presentar los resultados de las TRA. Así los profesionales son a menudo reacios a abogar por la eSET para sus pacientes debido a la preocupación por la disminución de las tasas de embarazo (van Peperstraten et al., 2008a,b).

Una medida para disminuir las reticencias de los profesionales sería que los indicadores de eficacia actualmente utilizados en la evaluación de los resultados de las técnicas de FIV/ICSI se sustituyeran por otros que contemplen también el final del proceso y las tasas acumuladas teniendo en cuenta los ciclos de criotransferencias.

Así, sería conveniente reemplazar o complementar los índices tradicionales (“tasa de embarazo por ciclo”, y “tasa de embarazo por transferencia” por otros como la “tasa de implantación”, “tasa acumulada de recién nacido único por transferencia” y “tasa acumulada de recién nacido por embrión transferido”. Además es conveniente que los profesionales conozcan y compartan con sus pacientes que la tasa de embarazo acumulada se puede mantener con eSET (y posterior criotransferencia en su caso) en las pacientes seleccionadas.

El uso de esta información puede animar a los profesionales a aconsejar a sus pacientes el uso de la eSET en la práctica clínica diaria, ya que ellos tienen la obligación profesional y ética de aumentar las posibilidades de un parto único a los futuros padres.

5.3.2 Educación del paciente

La educación del paciente es vital para la aceptación de la eSET y presenta matices particulares. Los pacientes se alarman por la posible disminución de la tasa de embarazo con la eSET, además numerosos estudios han encontrado que una

clara mayoría de los pacientes prefieren embarazos gemelares sobre los embarazos únicos (Goldfarb et al., 1996; Grobman et al., 2001; Pingborg et al., 2003; Hojgaard et al., 2007; Gleicher et al., 2009; Gleicher et al., 2013). Tales actitudes pueden deberse a conceptos erróneos que subestiman la eficacia de la eSET y de los riesgos y las consecuencias para la salud asociados con los embarazos múltiples.

Acciones informativas hacia pacientes han demostrado aumentar la aceptación de la eSET por las pacientes (Ryan et al., 2007; Ryan et al., 2004; Coetzee et al., 2007; Newton et al., 2007). En el primer estudio, las preferencias de los pacientes por embarazo gemelar se redujo a la mitad después de comparar los riesgos para la salud materna, fetal y neonatal entre embarazos únicos y embarazos gemelares (Ryan et al., 2007).

Otro estudio presentó que después de la explicación de los riesgos asociados, el deseo de embarazo gemelar se redujo significativamente entre las parejas, y la eSET se convirtió en la opción preferida (Newton et al., 2007). El uso de materiales educativos para pacientes donde se describen las ventajas de eSET y los riesgos de DET condujo a triplicar el eSET en 1 año (Coetzee et al., 2007).

Un ensayo aleatorio demostró que un DVD es más eficaz que un folleto escrito presentando la misma información contrastando las tasas de éxito y los riesgos asociados con eSET contra DET; con el DVD hubo una mejor comprensión de los resultados y una mayor preferencia por la eSET (Hope et al., 2010).

5.3.3 Mejora en la selección embrionaria.

El éxito de la implantación de la eSET depende de la capacidad de seleccionar el embrión más viable en cualquier cohorte embrionaria. La elección del mejor embrión ó embriones para la transferencia se basa actualmente en la mayoría de centros en la evaluación morfológica estática ó dinámica, ya comentada anteriormente (sección 2.3). Actualmente, solo dos trabajos han utilizado la morfocinética embrionaria como método de selección en eSET (Hlinka et al., 2012; Kirkegaard et al., 2013a). Ninguno de estos estudios compara la utilidad en eSET de la selección embrionaria realizada con morfología estática vs morfología dinámica.

Tras la morfología embrionaria, la técnica de selección embrionaria más utilizada ha sido el DGP. Hoy día, tras demostrar la baja eficiencia de la biopsia en día+3 y el análisis cromosómico mediante FISH (Zamora et al., 2011), la mayoría de los centros recomiendan la biopsia de trofoectodermo y el uso de técnicas genéticas moleculares, como la CGH. Actualmente, son varios los autores que han demostrado la utilidad de esta técnica en eSET (Schoolcraft et al., 2013; Yang et al., 2012).

Aunque otra técnica diagnóstica genética molecular como PCR cuantitativa en tiempo real, NGS ó polimorfismo de nucleótido único se han aplicado a material embrionario, no existen aún estudios con aplicación clínica (Wu et al., 2014).

Otras tecnologías emergentes están esperando a utilizarse para la selección embrionaria. Su uso no se limita sólo a analizar la secretómica o transcriptómica de los embriones, analizando los medios de cultivo donde se han cultivado estos (Seli et al., 2010; Katz-Jaffe et al., 2009; McReynolds et al., 2011; Gardner et al., 2001; Warner et al., 2008; Nagy et al., 2008; Sturmey et al., 2008), sino que abarca a la metabolómica del líquido folicular (Vergouw et al., 2012; Lédée et al., 2013) e incluso a la transcriptómica de las células del cúmulo ovocitario (Wathlet et al., 2013).

5.3.4 Mejora en la criopreservación embrionaria

5.3.4.1 Vitrificación y eSET

El éxito en un programa de crioconservación de embriones es fundamental para la aplicación práctica de eSET. Sin la capacidad de almacenar los embriones viables para su uso posterior, la transferencia electiva de embrión único sería difícil de sostener.

Actualmente, la crioconservación embrionaria ha mejorado notablemente sus resultados, debido a que la vitrificación proporciona mejores tasas de supervivencia embrionaria y gestación que la congelación lenta tradicional (Loutradi et al., 2008). Además, los datos que se desprenden de diferentes estudios sobre el huso meiótico de ovocitos descongelados con diferentes protocolos de congelación sugieren que la vitrificación es el método menos perjudicial (Larman et al., 2007; Cobo et al., 2008; Martínez-Burgos et al., 2011).

La principal ventaja de la vitrificación es la ausencia de formación de cristales de hielo. Este método se basa en la solidificación de los solutos a baja temperatura, mediante el aumento extremo de la viscosidad durante el enfriamiento rápido. Los protocolos lentos de congelación se basan en disminuciones graduales de temperatura ($-0,3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) para que exista una formación de cristales de hielo fuera de la célula. Sin embargo, esto sólo reduce la cantidad de agua del interior de la célula de un 70% a un 30%, con lo que aún se forman cristales en su interior.

En cambio, la vitrificación depende de una tasa rápida de congelación $23.000^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, y una alta viscosidad de los crioprotectores, con lo que evita la formación de cristales en el interior de la célula (Al-Hasani et al., 2007; Cobo et al., 2007). La alta osmolaridad del medio de vitrificación deshidrata rápidamente la célula y su inmersión en el nitrógeno líquido solidifica la célula antes de que el agua intracelular restante tenga tiempo de formar cristales de hielo perjudiciales. El resultado es que la célula solidifica adquiriendo una consistencia similar al vidrio.

Dos aspectos importantes de esta técnica son los elevados niveles de toxicidad del crioprotector a temperatura ambiente (Shaw et al., 1992) y su habilidad para vitrificarse y desvitrificarse lo suficientemente rápido para evitar la formación de cristales (Vatja et al., 1998). Ya se han comunicado estudios de seguimiento de niños nacidos de embriones vitrificados por diversos métodos (Lyu et al., 2013), demostrando la seguridad de esta técnica.

5.3.4.2 Receptividad endometrial en criotransferencia

El aumento de criotransferencias observado en los últimos años (Kupka et al., 2014; Prados et al., 2014a;) debido a la generalización de la vitrificación, ha permitido demostrar que la tasa de implantación es superior con embriones vitrificados que con frescos (Roque et al., 2013). Varios estudios han demostrado que la receptividad endometrial se ve afectada por los protocolos de estimulación ovárica (Papanikolaou et al., 2005; Horcajadas et al., 2005; Haozi et al., 2010; Boomsma et al., 2010), y que dicho efecto deletéreo no tendría lugar cuando se transfieren embriones desvitrificados en ciclos naturales ó de sustitución con una simple preparación endometrial hormonal.

Esto ha llevado a diversos autores a proponer la vitrificación de todos los embriones obtenidos en ciclos en fresco y transferirlos en ciclos posteriores con endometrios libres del efecto nocivo de la estimulación ovárica (Devroey et al, 2011; Roque et al., 2013). Estas observaciones, apoyaría la opinión de algunos grupos que pronostican una mayor tasa de gestación en estrategias de eSET con los embriones vitrificados que con embriones transferidos en fresco (Practice Committee of the SART and Practice Committee of the ASRM; 2012; Maheshwari and Bhattacharya, 2013).

5.3.5 Cobertura sanitaria y eSET.

Ya mencionamos la influencia de la cobertura sanitaria en la tasa de gestación múltiple tras TRA, siendo esta menor en centros con algún tipo de cobertura pública (Navarro et al., 2008; Vélez et al., 2014). Sin embargo, el único estudio que analiza la implantación de la eSET en centros públicos y privados, demostró que ésta es mayor en centros privados en nuestro país (Castilla et al., 2009). Los autores achacan esta menor implantación en centros públicos del eSET a dos factores. En primer lugar, la mayor reticencia de los profesionales debido a la menor efectividad de las TRA descrita en estos centros, la cual se ha asociado con pacientes de peor pronóstico y a la cartera de TRA limitada. En segundo lugar, al rechazo de los pacientes por tener limitado el número de ciclos en el sistema público (máximo 2-3 ciclos), que les lleva a asumir mayores riesgos de embarazo múltiple con el objeto de obtener la máxima probabilidad de gestación en ese número de ciclos limitado.

Los centros públicos están obligados a una especial sensibilidad hacia la prevención de las complicaciones de los tratamientos de reproducción asistida, y sobre todo de la gestación múltiple. Esta visión viene determinada por alguna de las fortalezas que pueden considerarse ventajas naturales de los centros públicos de reproducción: proximidad con la asistencia perinatal y ausencia de búsqueda de beneficio empresarial en el balance coste/efectividad a corto plazo.

Sin embargo, los profesionales de los centros de reproducción asistida de los centros públicos carecen casi siempre, y por desgracia, de autonomía de decisión sobre las medidas precisas para incrementar la eficacia de los procedimientos y el rendimiento de los programas. Esta limitación constituye quizás la principal inercia

que limita y enlentece la introducción en su práctica clínica de actuaciones eficientes en la prevención de las complicaciones asociadas a la gestación múltiple.

Por todo esto creemos necesario evidencias clínicas de calidad en el entorno del Sistema Público de Salud de la verdadera utilidad de la eSET que permitan ser incorporadas en guías de la práctica clínica del Sistema Nacional de Salud.

OBJETIVOS

A pesar de los cambios legislativos y las recomendaciones de la SEF, la tasa de embarazo múltiple tras TRA sigue siendo superior en España a la media europea. Existen sólidas evidencias de que la eSET es la mejor estrategia para disminuir el embarazo gemelar en FIV, sin embargo su implantación en España es escasa, especialmente en el sistema público de salud.

La mayoría de los RCTs existentes sobre eSET han sido realizados en otros países, principalmente en países nórdicos, con escenarios económicos y sociales completamente diferentes a los de nuestro país.

Por todo lo anterior, creemos que son necesarios ensayos clínicos en nuestro entorno que analicen la utilidad clínica de la eSET. Es por ello que en nuestro estudio nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Comparar la tasa de embarazo acumulada tras FIV/ICSI con transferencia electiva de embrión único en fresco más criotransferencia de un embrión, frente a la obtenida tras la transferencia de dos embriones en fresco en mujeres de buen pronóstico.
2. Analizar la influencia de la transferencia electiva de embrión único más criotransferencia de un embrión en la tasa de gestación gemelar múltiple.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes

1.1 Población de referencia

Pacientes que realizaron FIV-ICSI como TRA en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada entre los años 2010-2013.

1.2 Población de estudio

Pacientes con diagnóstico de esterilidad y buen pronóstico reproductivo, que aceptaron participar en el estudio.

1.3 Evaluación clínica de los pacientes

Estudiamos a ambos miembros de la pareja con un estudio básico de esterilidad que englobó:

- Anamnesis en ambos miembros de la pareja.
- Exploración ginecológica de la mujer.
- Seminograma del varón.
- Estudio hormonal de la mujer que incluyó FSH y estradiol en el día tercero del ciclo.

1.4 Selección de pacientes

1.4.1 Criterios de inclusión

- Edad de la mujer menor de 38 años
- Índice de masa corporal de la mujer entre 19 y 29 kg/m²
- FSH menor de 15mUI/ml al tercer día del ciclo
- Primer ciclo de FIV/ICSI
- Segundo ciclo tras un intento previo con test de gestación positivo

1.4.2 Criterios de exclusión

- Más de cinco años de esterilidad
- Intervenciones quirúrgicas uterinas previas (miomas, endometriosis, hidrosalpinx)
- Malformaciones uterinas
- Abortos de repetición (2 o más abortos)
- Ciclos de FIV/ICSI previos sin éxito.

Los criterios de exclusión post-aleatorización fueron: gestación espontánea, cancelación de dos ciclos de estimulación, ningún ovocito maduro, ningún ovocito fecundado, motivos personales, existencia de un sólo embrión para transferencia embrionaria, cancelación de la transferencia por síndrome de hiperestimulación ovárica y crioconservación embrionaria por pólipo uterino.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (20 de Abril del 2009), cumpliendo los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y con la normativa vigente de protección de datos. El estudio fue financiado por el FIS (Nº FIS 09/01968) y registrado en la base de datos Clinical Trial (NIH) bajo el código identificador NCT01909570.

Tras la selección de parejas mediante la revisión de historias clínicas, nos entrevistamos con cada una de ellas para hacerle entrega de una hoja informativa sobre nuestro estudio y un consentimiento informado (**ANEXO 1 y 2**). La participación es voluntaria teniendo la pareja la posibilidad de revocar su consentimiento en cualquier momento. Todas las parejas al ser incluidas recibieron un ciclo extra en el sistema sanitario público.

2. Diseño del estudio

Las parejas se asignaron aleatoriamente a dos grupos:

- En el grupo 1 (eSET) se realizó transferencia electiva de un embrión seguida, en caso de no quedar embarazada, de un ciclo de criotransferencia de embrión único.
- En el grupo 2 (DET) se realizó transferencia de dos embriones.

Además analizamos otros dos grupos formado por las pacientes excluidas del estudio y por las pacientes que reunían los requisitos pero no aceptaron participar, en estos dos grupos se siguió la política actual del hospital de transferencia de dos embriones (DET).

La aleatorización se realizó el día en el que aceptaron participar en el estudio por el Embriólogo que realizó la entrevista utilizando un listado de números aleatorios generados por ordenador. Tanto las parejas como los clínicos conocieron el grupo al que pertenecían el día de la transferencia embrionaria, con el propósito de que no influyera en sus decisiones clínicas a la hora de controlar el ciclo de estimulación ovárica.

El resultado primario fue la tasa de embarazo evolutiva. Los resultados secundarios fueron la tasa de embarazo múltiple y la tasa de nacido vivo que se definió según las recomendaciones del Comité Internacional de Monitorización de las Técnicas de Reproducción Asistida (ICMART) (Zegers-Hochschild et al., 2009). También se analizaron las complicaciones que tuvieron ingreso hospitalario (riesgo de parto prematuro, ingreso en urgencias durante el embarazo, complicaciones neonatales y puerperales).

3. Métodos

3.1 Técnicas empleadas

3.1.1 Protocolos de estimulación

Las pacientes siguieron un tratamiento de estimulación de la ovulación, con el propósito de conseguir un desarrollo folicular múltiple. Se utilizaron protocolos de agonistas de la GnRH en la pauta de “Análogo largo” en 115 mujeres (70.2%), y de “Antagonista” en 49 mujeres (29.8%).

Ambos tratamientos siguieron los protocolos descritos a continuación:

- *Análogo largo*: Se utilizó un protocolo con agonistas de la GnRH que consiste en administrar desde el día 22 del ciclo 0,1 mg/día de análogo de la GnRH (Decapeptyl® 0.1; Lasa, Barcelona, España) hasta el día en que se inicia la administración de gonadotropina, en el que se reduce la dosis al 50% hasta el día de la hCG. Tras 10-14 días de administración del agonista se procede a comprobar la frenación hipofisaria mediante ecografía vaginal ovárica (ausencia de folículos y quistes). Si se confirma dicha hipofisectomía médica se comienza a administrar 300 UI de FSH recombinante (FSHr) al día (Gonal F®, Merck-Serono, Madrid, España) durante dos días, y 150 UI de FSHr desde el 3º al 7º día. En este día se realiza control ecográfico del desarrollo folicular y determinación sérica de estradiol con el fin de ajustar nuevamente la dosis de FSHr a cada paciente. Una vez que la respuesta folicular es adecuada (más de 3 folículos ováricos mayores de 18 mm de diámetro) se procede a desencadenar la ovulación mediante 250 microgramos de coriogonadotropina alfa (Ovitrelle®, Merck -Serono, Madrid, España).
- *Antagonista*: El tratamiento comienza el día 2 del ciclo con 225 UI/día vía subcutánea de FSH recombinante (Gonal F®, Merck-Serono, Madrid, España) con pauta descendente dependiendo de los controles ecográficos cada 2 días a partir del octavo día del ciclo. Se instaura tratamiento con antagonistas de la GnRH (Orgalutran®, Merck Sharp & Dohme, España) a dosis de 0.25mg/día vía subcutánea cuando se observa algún folículo con diámetro mayor de 14mm o más por ecografía. Cuando se visualizan folículos de 18mm o más de diámetro se desencadena la ovulación del mismo modo siguiendo el protocolo anterior.

3.1.2 Etapas en el laboratorio de FIV-ICSI

La recuperación ovocitaria se realizó por punción folicular ecoguiada vía transvaginal 36 horas después de la inyección de hCG-r, anticipándose al proceso ovulatorio. Utilizando una aguja de punción ovárica (Labotect Labor-Technik-Göttingen, Göttingen, Germany) puncionamos uno a uno los folículos mayores de 17 mm aspirando su contenido en tubos de recogida de líquido folicular (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) con un sistema de vacío a 150 mm de Hg de presión. El contenido del folículo aspirado se transportó rápidamente al laboratorio de reproducción en un contenedor previamente calentado a 37°C para comprobar de inmediato la presencia del complejo cúmulo-corona-ovocito en el líquido folicular. No se realiza de forma habitual profilaxis antibiótica, y tan sólo en los casos en que la punción ofrezca mayor dificultad se administró vía intravenosa una dosis única de 1.500 mg de cefuroxima sódica (Cefuroxima Normon EGF, Madrid, España) o de 1.000 mg de lactobionato de eritromicina (Pantomicina Abbot, Madrid, España) en pacientes alérgicas a betalactámicos.

Una vez que los líquidos foliculares llegaban al laboratorio, se inició la búsqueda e identificación del ovocito. Para ello se depositaban en una placa de petri de 100x15 mm y bajo visión estereomicroscópica se observaban para localizar el complejo cúmulo-corona-ovocito. Identificado éste, mediante una pipeta Pasteur se colocaba en una nueva placa de Petri de 35x10 mm en el interior de unas gotas de medio de cultivo MOPS Vitrolife (MOPS Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) previamente calentado a 37°C, para eliminar los restos de LF. Se depositaron los cúmulos en medio de cultivo de maduración IVF Vitrolife (IVF Science Scandinavia, Gotheburg, Sweden) hasta la realización de la ICSI.

Para realizar la microinseminación espermática (ICSI) es necesario eliminar el cúmulo y la corona radiada del ovocito. Para decumular se sumerguía el complejo cúmulo-corona-ovocito en una solución con 80 UI/mL de hialuronidasa (HYASE, Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) en medio de lavado MOPS Vitrolife (MOPS Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) durante 10-20 segundos aspirando varias veces el complejo mediante pipeta pasteur. La actuación sobre la corona radiada se realizó mecánicamente haciendo pasar al ovocito varias veces por un capilar con un diámetro adecuado (125µm).

Las micropipetas utilizadas para la microinyección son HOLDING e ICSI (Origio, Humagen Pipets). La placa en la que se realizó la ICSI estaba cubierta de aceite mineral (OVOIL, Sciende Scandinavia, Gotheburg, Sweden) para mantener la osmolaridad y temperatura del medio (aunque la placa estaba además colocada sobre una superficie calefactora del microscopio). En dicha placa se colocaron gotas de polivinilpirrolidona (PVP Science Scandinavia, Gotheburg, Sweden) ya que ralentiza el movimiento de los espermatozoides y facilita la manipulación del espermatozoide seleccionado. También se colocaron varias gotas de medio MOPS. En la gota de PVP se depositaba un volumen de espermatozoides dependiendo de la concentración. Los ovocitos que se microinyectaron se colocaban en las gotas de MOPS, donde no permanecían más de 15 minutos.

Tras comprobar el correcto funcionamiento de la pipeta de inyección se seleccionaron los espermatozoides según morfología y movilidad; el espermatozoide seleccionado se inmovilizó por presión mecánica de la cola. Con esto se consigue la activación por permeabilización de membranas ya que se liberan factores citosólicos que activan al ovocito y facilitarán la posterior formación del pronúcleo masculino. Tras la inmovilización, se aspiró por la cola para asegurarnos de que al inyectarlo no se quedaba fuera la cabeza.

El ovocito se fijó usando la pipeta holding, o de sujeción, se colocó la pipeta de inyección con el espermatozoide frente al ovocito, se presionó para atravesar la zona pelúcida y la membrana plasmática, se aspiró primero suavemente para asegurarnos de haber penetrado la membrana, luego se depositó la pequeña fracción de citoplasma aspirado junto con el espermatozoide en el interior del ovocito. Una vez microinyectados los ovocitos se cultivaron en una placa con medio de cultivo (G1, Sciende Scandinavia, Gotheburg, Sweden) en un incubador a 37°C y a 6% de CO₂.

Los signos de fecundación son observados 17-20 horas post-microinyección; siendo desechados los cigotos 3PN y 1PN.

3.1.3 Calidad embrionaria y ovocitaria

Para evaluar la calidad embrionaria y ovocitaria, lo que nos permitió transferir el/los mejores embriones, se evaluaron los ovocitos y los siguientes estadios del

desarrollo: cigoto, división temprana, segundo día (D+2) y tercer día de cultivo (D+3), siguiendo las recomendaciones de ASEBIR (Asociación para el estudio de la biología de la reproducción) (Arday et al., 2008).

En el ovocito se evaluaron las posibles alteraciones citoplasmáticas como granulosidad central, agregación del retículo endoplasmático liso, vacuolas e inclusiones citoplasmáticas, así como las alteraciones morfológicas extracitoplasmáticas como exudados en el espacio perivitelino, anomalías de la zona pelúcida, espacio perivitelino aumentado y alteraciones del primer corpúsculo polar.

En el cigoto (16-19 horas post-ICSI) se evaluó la fecundación mediante: número de corpúsculos polares (CP) y apariencia, número pronuclear y apariencia de los pronúcleos (PN) según la clasificación de Scott et al. (2000) y presencia de halo citoplasmático.

En D+1 también se evaluó la división temprana a dos células a las 25-27 horas, registrándose asimismo parámetros como simetría celular, el porcentaje y tipo de fragmentación, anillo citoplasmático, presencia de vacuolas, grado de compactación temprana, moteado y grado de multinucleación. En D+2 (44-47 horas post inseminación) y D+3 (67-71 horas post inseminación) se tuvo en cuenta además de los citados parámetros la sincronía de división celular.

3.1.4 Vitrificación

Los embriones fueron criopreservados el tercer día (D+3) mediante vitrificación. Se utilizaron medios comerciales de vitrificación (Medicult Vitrification, Denmark) y desvitrificación (Medicult Vitrification Thaw, Denmark). El dispositivo de almacenamiento utilizado fue el Cryoleaf (McGill Cryoleaf, Origio, Denmark). Todos los embriones criopreservados se almacenaron en nitrógeno líquido a -196°C en bombonas de almacenamiento (Air Liquide, Francia).

Protocolo de vitrificación

Los embriones se vitrificaron mediante los medios de equilibrado y vitrificación de MediCult Vitrification que contienen etilen-glicol y 1,2-propandiol en HTF, en concentraciones crecientes.

En primer lugar se atempera el Equilibration Medium (EQ) y Vitrification Medium (VT) durante 30 minutos. Una vez atemperados podemos depositar una

microgota de EQ (100 µl) y otra de VT (100 µl) en una placa de petri mediana (Falcon®). Éstas deben quedar visualmente cerca bajo la lupa. Además se añaden 2 microgotas de medio de lavado MOPS de 100 µl/microgota. El embrión a vitrificar se lava en las dos gotas de MOPS y se depositan en la gota de EQ durante al menos 6 minutos con la lupa apagada. Transcurridos los 6 min el embrión debe haberse reexpandido al 80%, momento en el que se deposita en la gota de VT (100 µl). Se carga el embrión en el capilar y se deposita en el extremo de la lengüeta del cryoleaf (previamente identificado con el código de la paciente) con el mínimo medio posible. Este paso debe durar el menor tiempo posible, nunca más de 1 minuto. Rápidamente se sumerge el cryoleaf en el contenedor de nitrógeno líquido y se agita vigorosamente en zig-zag, con cuidado de no tocar con la lengüeta el fondo del barreño. Seguidamente, y antes de que se congele el cryoleaf, se baja el pestillo de seguridad del mismo. Con ayuda de la pinzas se introduce el cryoleaf en el visotubo, previamente sumergido en el contenedor de N₂ líquido, con las pinzas asegurándose de que no flote y se pasa a un termo para ser transportado al contenedor de Nitrógeno líquido.

Protocolo de sustitución para Criotransferencia

El día de la menstruación se inicia pauta ascendente con Valerianato de estradiol (Meriestra®, Noveartis Farmaceutica, España), administrándose 2mg/24h durante 8 días, después durante 3 días (9-11 del ciclo) se administra 2mg/12h y a partir del día 12 se aumenta a 2mg/8h. Se realizan revisiones ecográficas a los 14 días de iniciar el tratamiento para valorar el endometrio y cuando el espesor es ≥ 7mm de espesor, se indica para criotransferencia. Además se administra tres días antes de la criotransferencia progesterona natural micronizada vía vaginal 200mg/8h (Progeffik®, Laboratorios EFFIK, España).

Protocolo de desvitrificación

Para la desvitrificación embrionaria utilizamos los medios MediCult Vitrification Thaw que incluye un medio de descongelación con sacarosa listo para usar (Warming), medios de disolución 1 & 2, ambos con decrecientes concentraciones de sacarosa y dos viales para lavar el medio con HSA.

La desvitrificación embrionaria se realiza el día anterior a la criotransferencia. Para ello, se calientan los medios, Warming Medium a 37°C y Dilution Medium 1, Dilution Medium 2 y Washing Medium a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se prepara un depósito con suficiente nitrógeno líquido como para poder sumergir por completo el visotubo con el cryoleaf dentro. Se extrae el cryoleaf del visotubo y se deja en el fondo, sacamos el visotubo y comprobamos la identidad. En placas de petri medianas se deposita una microgota de 100 µl de DM1 y una microgota de 200 µl de Warming medium en otra placa de petri. Es muy importante que este medio esté a 37 °C durante todo el proceso, por lo que se dispone sobre una placa termocalefactada. Posteriormente se saca el cryoleaf del barreño de nitrógeno líquido con la cara del embrión mirando hacia arriba y se sumerge rápidamente en la microgota de Warming medium. Rescatamos el embrión y lo llevamos a la gota de DM1 donde se esperan 3 min. En este tiempo se deposita al lado de esta microgota la de DM2, donde se depositará el embrión posteriormente durante 3 minutos. Durante este tiempo depositamos en esta placa 4 microgotas de 50 µl de Washing medium. Una vez transcurridos los 3 minutos se rescata el embrión de DM2 y se lava progresivamente de una gota a otra de dicho medio. En una placa de petri se realizan 4 microgotas de 50 µl de medio de cultivo embrionario G2 previamente gasificado.

Cargamos G2 de una microgota y lavamos progresivamente de una gota a otra de dicho medio. Al finalizar se lava el embrión en medio G2, dejándolos en cultivo, 37°C y 6%CO₂, hasta el día siguiente, previa valoración de la calidad embrionaria y de la criosuperviviencia (porcentaje de células lisadas), en caso de que la superviviencia sea $\geq 50\%$ de las blastómeras. El día de la criotransferencia (D+4) se valora de nuevo la calidad embrionaria, haciendo hincapié en la división embrionaria. La criotransferencia se realiza de la misma manera que la transferencia en fresco.

4. Análisis de datos y métodos estadísticos

4.1 Recogida de datos y fuentes de información

La recogida de datos se realizó mediante la creación de una hoja de datos con todas las variables motivo del análisis. Los datos fueron almacenados en una base informática tipo Access (Microsoft® Access, 2003).

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este estudio se realizó mediante los paquetes estadísticos SPSS 20.0 para Windows (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc®) y MedCalc (Software, Mariakerke, Belgium).

4.2 Variables a analizar

- Edad (años). Variable cuantitativa discreta
- Años de esterilidad. Variable cuantitativa discreta
- Dosis total de FSH (UI/ml). Variable cuantitativa continua.
- Niveles de estradiol el día de la hCG (pg/ml). Variable cuantitativa continua.
- Días de estimulación. Variable cuantitativa discreta.
- Número de ovocitos obtenidos tras la punción folicular. Variable cuantitativa discreta.
- Número de ovocitos maduros (en metafase II de división celular). Variable cuantitativa discreta
- Número de ovocitos fecundados. Variable cuantitativa discreta
- Número total de embriones obtenidos. Variable cuantitativa discreta
- Número de embriones de buena calidad según la clasificación de ASEBIR (Ardoy et al., 2008). Variable cuantitativa discreta.
- Número de embriones transferidos. Variable cuantitativa discreta.
- Número de embriones congelados. Variable cuantitativa discreta.
- Consecución de embarazo clínico (considerado como tal cuando se observa saco embrionario con latido cardiaco a las siete semanas gestacionales). Variable cualitativa nominal dicotómica con valores si o no.
- Consecución de embarazo a término (considerado como tal aquel en el que se produce el nacimiento de un niño sano ente la semana gestacional 37 y 42). Variable cualitativa nominal dicotómica con valores si o no.

- Aborto. Variable cualitativa nominal dicotómica con valores si o no.
- Embarazo múltiple (2 o más sacos gestacionales por ecografía). Variable cualitativa nominal dicotómica con valores si o no.
- Porcentaje de embarazo por transferencia embrionaria en cada grupo de pacientes, siendo en el primer grupo un porcentaje acumulado de los embarazos en fresco más los obtenidos tras criotransferencia.
- Porcentaje de nacido vivo por transferencia embrionaria en cada grupo de pacientes, siendo en el primer grupo un porcentaje acumulado de los recién nacidos en fresco más los obtenidos por criotransferencia.

4.3 Método estadístico

Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó en base a la tasa de gestación evolutiva por transferencia para una hipótesis de no inferioridad. Nosotros estimamos una tasa de gestación clínica del 41% para la transferencia de dos embriones, basado en los resultados obtenidos por un ensayo clínico randomizado con criterios de inclusión similares a los nuestros (van Montfoort et al., 2006). Considerando que la eficacia de la eSET en fresco y tras desvitrificación es la misma, estimamos un margen de no-inferioridad del 50%. Nosotros calculamos un total de 112 pacientes necesarias (56 en cada brazo) para detectar un 20.5% de diferencia en la tasa de gestación evolutiva con una potencia del 90% y un nivel de significación de $p < 0.05$.

Como la aleatorización (intención a tratar) de las pacientes se hizo antes del tratamiento de estimulación ovárica, no fuimos capaces de estimar a priori el número necesario de pacientes aleatorizados con el fin de alcanzar el tamaño de muestra de 56 pacientes en cada grupo el día de la transferencia, según los cálculos del análisis para el resultado primario del estudio. Sin embargo, en base a nuestra experiencia se estimó que un tercio de los pacientes asignados al azar no se podrían incluir en el análisis por diferentes causas (embarazo espontáneo, ciclos cancelados, síndrome de hiperestimulación ovárica, no ovocitos maduros o fecundados y menos de 2 embriones en el día de la transferencia). Por lo tanto, estimamos que necesitábamos

aleatorizar al menos 150 pacientes con el fin de alcanzar al menos 56 pacientes en cada brazo, según lo calculado anteriormente.

Análisis estadístico

a. Análisis descriptivo

Para describir las variables cualitativas se utilizó el valor absoluto y relativo. Las variables cuantitativas se describieron utilizando la media, desviación estándar (SD), valor máximo y mínimo.

b. Estudio de la normalidad de las variables

Para comprobar si las variables seguían una distribución normal se utilizó el test de Shapiro-Wilk, rechazándose la hipótesis de normalidad por debajo de un valor $p < 0,05$.

c. Comparación de variables cualitativas entre grupos.

Para la comparación de variables cualitativas entre grupos se utilizó el test chi-cuadrado y en caso de no cumplirse las condiciones de validez de este test se utilizó el test de Fisher. Al haber un número muy grande de comparaciones, se realizó una penalización de la significación (corrección de Bonferroni), dándose como significativas solo aquellas que lo fueran por debajo de un $p < (0,05/n^{\circ}$ de comparaciones). El tamaño del efecto se estimó mediante el calculado de la Odds Ratio y su intervalo de confianza al 95%.

d. Comparación de variables cuantitativas entre grupos

Para la comparación de variables cuantitativas entre dos grupos (que se ajustaban a una distribución normal) realizamos el test de Levene para comprobar la homogeneidad de las varianzas. Si dicho test resultaba significativo se realizaba el test de Welch, y si el test de Levene resultaba no significativo se calculaba la t de Student clásica. El tamaño del efecto se calculó mediante la diferencia de medias y su intervalo de confianza al 95%.

La comparación de variables cuantitativas que no seguían una distribución normal, se realizó mediante técnicas no paramétricas. En el caso de la comparación de dos grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Dado el elevado número de comparaciones se aplicó la corrección de Bonferroni al nivel de significación, considerando significativa $p < (0,05/n^{\circ}$ de comparaciones).

RESULTADOS

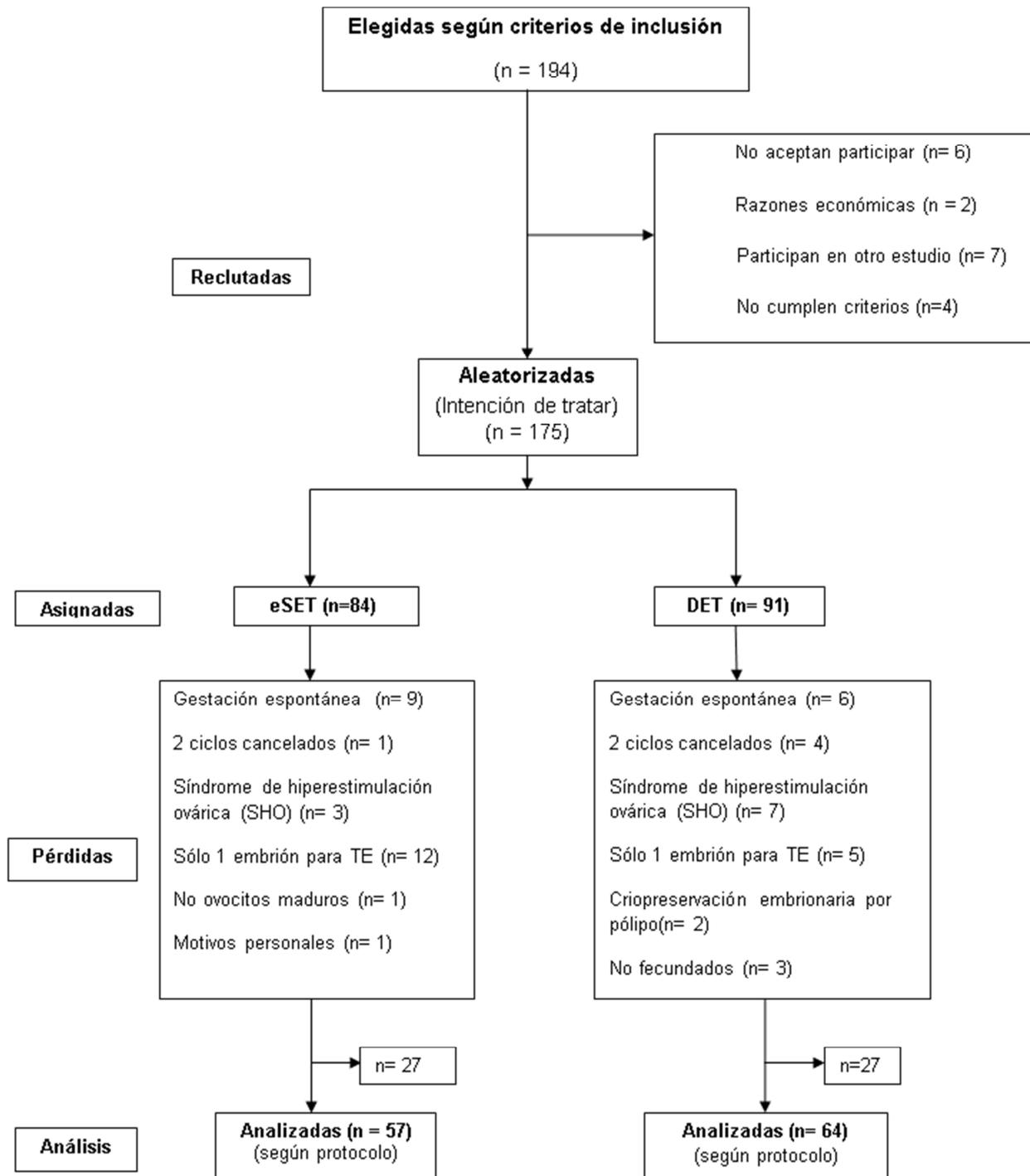
1. Descripción de la muestra

Un total de 194 mujeres menores de 38 años fueron incluidas en el estudio. Hubo 19 mujeres que no fueron aleatorizadas: no aceptaron participar (31.6%), motivos económicos (10.5%), participaban en otro estudio (36.8%) ó durante el proceso se descubrió que no cumplían criterios (21.1%).

Por lo tanto, hubo intención de tratar a 175 mujeres, las cuales se aleatorizaron correspondiendo 84 pacientes al grupo eSET y 91 en el grupo DET. En ambos grupos tuvimos 27 pérdidas por diferentes motivos: gestación espontánea (27.8%), dos ciclos previos cancelados (9.3%), síndrome de hiperestimulación ovárica (18.1%), no ovocitos maduros (2.0%), crioconservación embrionaria por pólipo (3.7%), no fecundados (5.6%) ó sólo un embrión para transferencia embrionaria (31.5%), llegando al análisis según protocolo 57 pacientes en el grupo eSET y 64 en el grupo DET.

El grupo de pacientes excluidas antes de la aleatorización de las cuales recogimos los datos lo forman las mujeres que no aceptan participar (6) más las que participan en otro estudio (7). En total 13 pacientes. Además incluimos los datos de las pacientes excluidas después de la aleatorización, y que fueron en total 54 pacientes. Todo el proceso de descripción de la muestra queda reflejado en la (Figura 19).

Figura 19: Diagrama de flujo de las pacientes participantes en el estudio.



2. Características sociodemográficas

La media de edad fue similar para ambos grupos; en el grupo eSET la media de edad de las pacientes fue de $32,2 \pm 3,6$ años, mientras en el grupo DET fue de $31,7 \pm 3,8$ años.

No hubo diferencias significativas en la duración de la infertilidad, siendo muy similares la media de los años de esterilidad entre ambos grupos ($3,1 \pm 1,1$ en el grupo eSET vs $3,1 \pm 1,0$ en el grupo DET).

Tampoco hubo diferencias significativas en cuanto a la causa de indicación del tratamiento de fertilidad en ambos grupos. La Tabla 11 muestra las causas de esterilidad por las que a las parejas se les indicó TRA, siendo el factor masculino la más frecuente en ambos grupos (45,6% en eSET vs 46,9% en DET), seguida de esterilidad sin causa aparente (35,1% vs 26,6% en eSET y DET respectivamente)

Las características de las pacientes excluidas antes y después de la aleatorización (13 y 54 pacientes, respectivamente), se describen en la Tabla 12.

Tabla 11: Características de las parejas de los grupos eSET y DET por protocolo.

	eSET (n=57)			DET (n=64)			Mean difference (95%CI)
	Media	±	SD	Media	±	SD	
Edad de la mujer (años)	30,5	±	4,9	31,7	±	3,8	-0,5 (-1,84;0,84)
Rango	(20	-	36)	(20	-	37)	
Edad del hombre (años)	32,9	±	5,2	34,6	±	4,6	0,7 (-0,89;2,29)
Rango	(23	-	39)	(26	-	42)	
Duración de la infertilidad (años)	2,4	±	0,8	2,6	±	0,9	0,2 (-0,38;0,38)
Rango	(2	-	4)	(1	-	5)	
Causa de la infertilidad, n (%)							
Factor tubárico	2		(15,4)	7		(12,3)	
Factor masculino	2		(15,4)	19		(33,3)	
Desconocido	8		(61,5)	20		(35,1)	
Factor endocrino	0		(0,0)	0		(0,0)	
Mixto	1		(7,7)	4		(7,0)	
Otros	0		(0,0)	7		(12,3)	
NS							

Tabla 12: Características de las pacientes excluidas antes y después de la aleatorización.

	Excluidas antes de la aleatorización (n=13)			Excluidas después de la aleatorización (n= 54)		
	Media	±	SD	Media	±	SD
Edad de la mujer (años)	30,5	±	4,9	31,7	±	3,8
Rango	(20	-	36)	(20	-	37)
Edad del hombre (años)	32,9	±	5,2	34,6	±	4,6
Rango	(23	-	39)	(26	-	42)
Duración de la infertilidad (años)	2,4	±	0,8	2,6	±	0,9
Rango	(2	-	4)	(1	-	5)
Causa de la infertilidad, n (%)						
Factor tubárico	2		(15,4)	7		(12,3)
Factor masculino	2		(15,4)	19		(33,3)
Desconocido	8		(61,5)	20		(35,1)
Factor endocrino	0		(0,0)	0		(0,0)
Mixto	1		(7,7)	4		(7,0)
Otros	0		(0,0)	7		(12,3)

NS

3. Resultados de estimulación ovárica e ICSI en parejas eSET y DET

En la Tabla 13 están reflejados los resultados de estimulación ovárica e ICSI en parejas eSET y DET según protocolo. La dosis total empleada de FSH, los días de estimulación y los niveles séricos de estradiol el día de la hCG fueron similares en ambos grupos.

El protocolo de estimulación más utilizado fue el de Análogo largo. No encontramos diferencias significativas en su uso en ambos grupos siendo del 70,2% en eSET y 67,2% en DET. El protocolo de Antagonista fue utilizado de forma similar en ambos grupos (29,8% en eSET versus 32,8% en DET, respectivamente).

No hubo diferencias en cuanto al número de ovocitos obtenidos, número de ovocitos en metafase II, número de ovocitos fecundados y número de embriones disponibles de buena calidad (tipo A/B según la clasificación ASEBIR).

Se obtuvieron más embriones criopreservados en el grupo eSET ($2,3 \pm 1,9$) frente al grupo DET ($1,0 \pm 1,9$) ($p < 0,001$).

La proporción de implantación por transferencia fue similar en ambos grupos: 29.8% (28/92) en eSET (TE en fresco más criotransferencia) vs 29.7% (38/128) en DET.

No se observaron diferencias ni en el día ni en la dificultad de la transferencia entre los dos grupos (Tabla 14).

Los resultados de estimulación ovárica de las pacientes excluidas antes y después de la aleatorización se muestran en la Tabla 15.

Tabla 13. Resultados de estimulación ovárica e ICSI en parejas eSET y DET según protocolo

	eSET (n= 57)				DET (n= 64)				Media de las diferencias (95%CI)
	Media	±	SD	Rango	Media	±	SD	Rango	
Dosis total FSH	1759	±	564	925 - 4125	1938	±	704	750 - 5062	179(-52,5;10,5)
Días de estimulación	10,5	±	1,8	8 - 15	10,7	±	1,6	8 - 16	0,2(-0,41;0,81)
Estradiol día hCG	2294	±	1230	3500 - 5900	2390	±	1344	720 - 2570	96(-369,8;561,8)
Tipo de estimulación									
Antagonista, n (%)	17		(29,8)		21		(32,8)		
Análogo largo, n (%)	40		(70,2)		43		(67,2)		
Nº de punciones	57				64				
Nº ovocitos recogidos por punción	11,1	±	4,5	3 - 22	10,2	±	4,7	3 - 24	-0,9(-2,56;0,76)
Nº de ovocitos maduros para ICSI por punción	9,0	±	3,9	2 - 18	8,2	±	4,4	2 - 20	-0,8(-2,3;0,7)
Nº de ovocitos normalmente fecundados por punción	5,9	±	3,3	2 - 15	5,6	±	3,7	2 - 20	-0,3(-1,57;0,97)
Proporción de ovocitos normalmente fecundados por punción, (%)	65,6				68,3				
Calidad embrionaria									
Embriones disponibles de buena calidad ^a	2,4	±	1,9	0 - 9	2,0	±	1,8	0 - 12	-0,4(-1,07;0,27)
Calidad embrionaria, n (%)									
Tipo A	40		(42,5)		54		(42,2)		
Tipo B	22		(23,4)		32		(25,0)		
Tipo C	28		(29,8)		36		(28,1)		
Tipo D	4		(4,3)		6		(4,7)		
Embriones criopreservados ^b	2,3	±	1,9	1 - 10	1,0	±	1,9	0 - 12	-1,3(-1,99;-0,61)
Proporción de implantación con embriones en fresco (%)			(33,3)				(29,7)		
Proporción de implantación (fresco + crioconservado) (%)			(29,8)						

^a(eSET:fresco+criotransferencia)(DET:fresco), ^bDETvseSET(p<0,001); CI, intervalo de confianza

Tabla 14. Día y dificultad de la transferencia embrionaria

	eSET (n=57)		DET (n=64)	
	n	(%)	n	(%)
Transferencia embrionaria				
Día de la transferencia embrionaria				
Día 2	21	(36,8)	26	(40,6)
Día 3	36	(63,2)	38	(59,4)
Dificultad de la transferencia embrionaria ^a				
Fácil	84	(89,3)	58	(90,6)
Moderada	8	(8,5)	5	(7,8)
Difícil	2	(2,2)	1	(1,6)
Presencia de sangre	9	(10,0)	8	(12,5)
Presencia de moco	18	(20,0)	14	(22,0)

^a(eSET: fresco + criotransferencia) (DET: fresco).

Tabla 15: Resultados de estimulación ovárica e ICSI en las parejas excluidas antes y después de la aleatorización.

	Excluidas antes de la aleatorización (n= 13) ^a				Excluidas después de la aleatorización (n= 33) ^b			
	Media	±	SD	Rango	Media	±	SD	Rango
Dosis total FSH	2375	±	1049	800 - 4300	1946	±	408	950 - 4800
Días de estimulación	12,4	±	2,1	8 - 14	11,2	±	1,2	8 - 15
Estradiol día hCG	1555	±	607	2250 - 4500	3069	±	892	1000 - 3430
Tipo de estimulación								
Antagonista, n (%)	5		(38,5)		6		(20,0)	
Análogo largo, n (%)	8		(61,5)		24		(80,0)	
Nº de punciones	13				33			
Nº ovocitos recogidos por punción	9,0	±	3,9	4 - 16	9,1	±	5,5	1 - 20
Nº de ovocitos maduros para ICSI por punción	8,0	±	3,6	3 - 15	6,7	±	4,9	0 - 17
Nº de ovocitos normalmente fecundados por punción	6,2	±	3,9	2 - 14	3,7	±	3,6	0 - 12
Tasa de ovocitos normalmente fecundados por punción, (%)	77,5				55,2			
Calidad embrionaria								
Embriones disponibles de buena calidad	2,9	±	2,7	0 - 10	1,5	±	1,9	0 - 9
Embriones criopreservados	1,5	±	2,4	0 - 8	1,0	±	1,8	0 - 7
Día de la transferencia embrionaria ^c								
Día 2, n (%)	4		(30,8)		19		(63,3)	
Día 3, n (%)	9		(69,2)		11		(36,7)	

^a (No aceptan participar n=6; participan en otro estudio n=7). ^b (No ovocitos maduros n=1; No fecundados n=3; Síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS) n=10; Pacientes con un embrión el día de la transferencia embrionaria n=17; Criopreservación de embriones por pólipo n=2). ^c (Pacientes con 1 embrión el día de la TE n=17; no se incluye OHSS n=10 ni criopreservación por pólipo n=2 ya que no tuvieron TE en fresco. Tampoco incluimos No ovocitos maduros n=1 y No fecundados n=3 por no tener embriones disponibles para la TE).

4. Resultados de gestación en las parejas eSET y DET.

4.1 Resultados de las parejas eSET y DET según protocolo

La proporción de gestación clínica acumulada por transferencia fue del 49.1% (28/57) en el grupo eSET (fresco + criotransferencia) y la proporción de gestación clínica por transferencia en fresco en el grupo DET fue de un 46.9% (30/64), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

La proporción de embarazo múltiple fue significativamente menor en el grupo eSET comparada con el grupo DET (0% vs 27.6%; $p < 0.05$).

La proporción de aborto global fue similar en ambos grupos (21.4% en eSET vs 10.0% en DET).

La proporción de nacido vivo acumulada (eSET: fresco + criotransferencia) fue similar en ambos grupos (38.6% en eSET vs 42.2% en DET) (Tabla 16).

Tabla 16: Resultados de gestación en las parejas eSET y DET según protocolo.

	eSET (57)		DET (64)		OR
	n	(%)	n	(%)	(95%CI)
Proporción de gestación clínica por transferencia embrionaria					
Gestación clínica en fresco	19	(33,3)	30	(46,9)	0,57(0,27;1,19)
Gestación clínica acumulada	28	(49,1)			1,09(0,54;2,24)
Gestación clínica múltiple	0	(0,0)	8	(27,6) ^a	0,11(0,03;0,49)
Criotransferencias					
Gestación clínica	9	(24,3)			
Proporción de aborto global	6	(21,4)	3	(10,0)	2,45(0,55;10,96)
Proporción de embarazo evolutivo	22	(38,6)	27	(42,2)	0,86(0,42;1,78)
Proporción de embarazo evolutivo múltiple	0	(0,0)	7	(25,9) ^a	0,15(0,03;0,86)
Proporción de nacido vivo por transferencia embrionaria					
Proporción de nacido vivo en fresco	14	(24,6)	27	(42,2)	0,45(0,20;0,97)
Proporción de nacido vivo en criotransferencia	8	(21,6)			
Proporción de nacido vivo acumulada	22	(38,6)			0,86(0,42;1,78)
Proporción de parto múltiple	0	(0,0)	7	(25,9) ^a	0,15(0,03;0,86)

^aDET vs eSET (p<0,05). CI intervalo de confianza. OR odds ratio

4.2 Resultados de las parejas eSET y DET según intención de tratar.

Los resultados según la intención de tratar se presentan en la Tabla 17. En este análisis incluimos en ambos grupos los resultados obtenidos por las pacientes con sólo un embrión el día de la transferencia embrionaria (8 gestaciones clínicas en el grupo eSET y 1 gestación en el grupo DET), las pacientes con gestación espontánea en los resultados de la tasa de nacido vivo (9 partos en el grupo eSET y 6 partos en el grupo DET) y aquellas pacientes que sólo reciben tratamiento con embriones criopreservados (3 pacientes en el grupo eSET con una gestación clínica y 8 pacientes en el grupo DET con tres gestaciones clínicas).

La proporción de implantación fue similar en ambos grupos (29.1% en eSET vs 21.2% en DET). La proporción de nacido vivo acumulada en el grupo eSET resultó en un 45.2% (38/84), valor ligeramente superior respecto a la tasa obtenida en el grupo DET que fue de un 40.6% (37/91).

El embarazo múltiple fue significativamente menor en el grupo eSET que en el grupo DET (0% vs 26.4%; $p < 0.05$).

Tabla 17 Resultados de gestación de las parejas eSET y DET según intención de tratar.

	eSET (84)		DET (91)		OR
	n	(%)	n	(%)	(95% CI)
Pacientes: ciclo en fresco ^a	69		69		
Pacientes: no ciclo en fresco ^b	15		22		
Pacientes: sólo criotransferencias ^c	3		8		
Proporción de implantación					
Fresco ^d	27	(32,1)	39	(21,4)	1,74(0,97;3,09)
Acumulada ^e	37	(29,1)	42	(21,2)	1,51(0,89;2,52)
Proporción de gestación clínica por transferencia embrionaria					
Gestación clínica en fresco ^d	27	(32,1)	31	(34,1)	0,92(0,49;1,72)
Gestación clínica acumulada ^e	37	(44,0)	34	(37,4)	1,45(0,78;2,68)
Proporción de embarazo múltiple	0	(0,0)	9	(26,4) ⁱ	0,05(0,00;0,89)
Proporción de aborto global ^f	8	(21,6)	3	(8,8)	2,67(0,64;11,11)
Proporción embarazo evolutivo	29	(34,5)	31	(34,1)	0,98(0,52;1,85)
Proporción de embarazo múltiple evolutivo	0	(0,0)	8	(21,0) ⁱ	0,05(0,00;0,83)
Proporción de nacido vivo por transferencia embrionaria					
Proporción de nacido vivo en fresco ^g	20	(23,8)	28	(30,7)	0,70(0,36;1,38)
Proporción de nacido vivo acumulada ^h	38	(35,2)	38	(41,8)	1,15(0,63;2,09)
Proporción de parto múltiple	0	(0,0)	8	(21,0) ⁱ	0,05(0,00;0,83)

^a Además de las pacientes incluidas en el análisis por protocolo, el grupo eSET incluye 12 pacientes con tan sólo un embrión en el día de la transferencia embrionaria. El grupo DET incluye 5 pacientes con un embrión.

^b El grupo eSET incluye: una paciente con dos ciclos cancelados, tres con síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), una con ovocitos no maduros, una paciente que no realizó tratamiento TRA por motivos personales y 9 pacientes con gestación espontánea. En el grupo DET: 4 pacientes tuvieron dos ciclos cancelados, siete tuvieron SHO, dos tuvieron ciclo de criotransferencia por pólipo, en 3 casos hubo fallo de fecundación y hubo 6 pacientes con gestación espontánea.

^c El grupo eSET incluye tres pacientes con SHO. El grupo DET incluye 7 pacientes con SHO y de las 2 en que se planeó ciclo de criotransferencia por pólipo uterino, una paciente quedó embarazada espontáneamente antes de la criotransferencia y no se realizó su ciclo de criotransferencia correspondiente. Las pacientes a las cuales se les realizó criotransferencia dos embriones fueron transferidos.

^d Además de las pacientes incluidas en el análisis por protocolo, el grupo eSET incluye: 8 gestaciones clínicas de 12 pacientes con un solo embrión el día de la transferencia. El grupo DET incluye una gestación clínica de 5 pacientes con un embrión el día de la transferencia.

^e Además de las pacientes incluidas en el análisis por protocolo, el grupo eSET incluye: 8 gestaciones clínicas de las doce pacientes con un solo embrión el día de la transferencia embrionaria más una gestación de las pacientes que fueron tratadas solamente en el ciclo de criotransferencia. El grupo DET incluye un embarazo clínico de las cinco pacientes con un solo embrión en día la transferencia más 3 embarazos entre los pacientes que fueron tratados solamente en el ciclo de criotransferencia.

^f Además de las pacientes incluidas en el análisis por protocolo, el grupo eSET incluye: 2 abortos espontáneos entre las doce pacientes con un solo embrión en el día de la transferencia embrionaria

^g Además de las pacientes incluidas en el análisis por protocolo, el grupo eSET incluye: 6 nacimientos entre las pacientes con un solo embrión en el día de la transferencia embrionaria. El grupo DET incluye un nacimiento entre las pacientes con un solo embrión en el día de transferencia embrionaria.

^h Además de las pacientes incluidas en el análisis por protocolo, el grupo eSET incluye: 9 nacimientos de los embarazos espontáneos, un nacimiento de la paciente que reciben el tratamiento sólo en el ciclo de criotransferencia y 6 nacimientos en las pacientes con un sólo embrión el día de la transferencia embrionaria. El grupo DET incluye 6 nacimientos de las pacientes con gestaciones espontáneas, 3 nacimientos en las pacientes tratadas solamente en el ciclo de criotransferencia, un nacimiento en la paciente con un solo embrión en el día de la transferencia y un nacimiento en la paciente embarazada de forma espontánea antes de la criotransferencia.

ⁱ DET vs eSET ($p < 0.05$).

4.3 Resultados de las parejas excluidas

Los resultados clínicos de los grupos excluidos se muestran en la Tabla 18. En las pacientes excluidas antes de la aleatorización se siguió la política habitual del hospital de transferencia de dos embriones; la proporción de gestación clínica por transferencia fue del 46.2% (6/13) con un 60% (3/5) de embarazo gemelar.

De las 17 pacientes con un sólo embrión, dos pacientes no tuvieron transferencia y 15 tuvieron transferencia única obligada, obtuvimos una proporción de gestación clínica del 60% (9/15), con una proporción de recién nacido vivo del 46.7% (7/15).

En las pacientes que se canceló la transferencia (por SHO y congelación por pólipo uterino), 11 mujeres tuvieron criotransferencia de dos embriones (una paciente quedó embarazada espontáneamente antes del ciclo de embriones vitrificados). En este grupo se obtuvo una proporción de nacido vivo por criotransferencia del 36.4% (4/11) y una proporción de parto múltiple del 25% (1/4).

Tabla 18: Resultados de las parejas excluidas.

	Antes de la aleatorización (n=13)		Excluidas después de la aleatorización con cSET (n=15) ^a		Excluidas después de la aleatorización por cancelación de TE (n=11) ^b	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Proporción de implantación	9	(34,6)	9	(60)	5	(27,8)
Proporción de gestación clínica por transferencia embrionaria	6	(46,2)	9	(60)	4	(36,4)
Proporción de aborto	1	(16,7)	2	(22,2)	0	(0)
Proporción de nacido vivo por transferencia embrionaria	5	(38,5)	7	(46,7)	4	(36,4)
Proporción de parto múltiple	3	(60)	0	(0)	1	(25)

^a Este grupo incluye las pacientes excluidas después de la aleatorización debido a que sólo tenían un embrión el día de la transferencia (n=15). ^b Este grupo incluye las pacientes excluidas después de la aleatorización por cancelación del ciclo debido a OHSS ó pólipo uterino.

5. Resultados de la técnica de vitrificación embrionaria en eSET

El porcentaje de supervivencia, definida como aquellas desvitrificaciones en que sobreviven $\geq 50\%$ de las blastómeras), fue del 88,1% (37/42) en el grupo eSET. Tras 24 horas de cultivo observamos que la tasa de división embrionaria fue del 70,2% (26/37)

La proporción de implantación observada fue del 24,3% (9/37). La proporción de nacido vivo por criotransferencia resultó en un 21,6% (8/37) Tabla 19.

Tabla 19: Resultados de la técnica de vitrificación embrionaria en eSET.

	Grupo eSET	
	n	(%)
Descongelaciones	42	
Criotransferencias	37	
Porcentaje de supervivencia ^a	37	(88,1)
Embriones divididos	26	(70,2)
Proporción de implantación	9	(24,3)
Gestación clínica por criotransferencia	9	(24,3)
Aborto	1	(11,1)
Embarazo evolutivo por criotransferencia	8	(21,6)
Proporción de nacido vivo por criotransferencia	8	(21,6)

^a (≥50% de las blastómeras)

6. Resultados obstétricos y neonatales de las parejas eSET y DET

6.1 Resultados obstétricos y neonatales de las parejas eSET y DET según protocolo

Tuvieron lugar 22 partos en el grupo eSET y 27 partos en el grupo DET. En el grupo eSET de los 22 partos, 14 fueron de las transferencias únicas en fresco y 8 de las criotransferencias de embrión único. En el grupo DET la proporción de parto gemelar fue del 26,9%, encontramos diferencias significativas con respecto al grupo eSET ($p < 0,05$). En la Tabla 20 se muestran los resultados. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en el tipo de presentación, comienzo y finalización del parto vaginal y cesárea.

En lo que se refiere a los datos neonatales se observó un menor peso medio en los recién nacidos del grupo DET, frente a los del grupo eSET (2800 ± 477 vs 3067 ± 340 gr, $p < 0,05$). Sin embargo no encontramos diferencias significativas en la semana gestacional media en el momento del parto (38.2 ± 3.4 en eSET vs 37.8 ± 2.3 en DET).

Aunque en el grupo de eSET hubo 3 partos pretérmino (13,6%) en el grupo DET la tasa de parto pretérmino fue mayor (32,4%), sin embargo esta diferencia no alcanzo significación estadística.

No se produjo ninguna muerte fetal en ningún grupo.

Tabla 20: Resultados obstétricos y neonatales de las parejas eSET y DET según protocolo.

	eSET + CRIOTE			DET			Media de las diferencias (95% CI)
	Media	± SD	Rango	Media	± SD	Rango	
Nº total de recién nacidos	22			34			
Nº total de partos	22			27			
Únicos, n (%)	22	(100)		20	(73,1)		
Múltiples							
Gemelares, n (%)	0	(0)		7	(26,9) ^a		
Triples, n (%)	0	(0)		0	(0)		
Tipo de parto							
Vaginal, n (%)	11	(50)		15	(55,6)		
Cesárea, n (%)	11	(50)		12	(44,4)		
Semana de gestación media	38,2	3,4	27 - 41	37,8	2,3	33 - 41	-0,4(-2,11;1,31)
Semana gestacional							
Parto a término (≥ 37 semanas gestación), n	19	(86,4)		19	(70,4)		
Nº de recién nacidos, n (%)	19	(86,4)		23	(67,6)		
Edad gestacional (semanas)	39 ± 2,0		37 - 41	38,9 ± 2,0		37 - 41	
Peso al nacimiento (gramos)	3235 ± 465		2500 - 3620	2920 ± 240,3		2180 - 3860	
Parto pretérmino (< 37 semanas gestación), n	3	(13,6)		8	(29,6)		
Nº de recién nacidos, n (%)	3	(13,6)		11	(32,4)		
Edad gestacional (semanas)	35 ± 1,0		27 - 36	35 ± 2,2		33 - 36	
Peso al nacimiento (gramos)	2455 ± 30,4		1090 - 2470	2289 ± 330,2		1750 - 2900	
Peso medio (gramos)	3067 ± 340		1090 - 3810	2800 ± 477		1750 - 3860 ^a	9267(-507,8;-26,2)
Bajo peso al nacimiento (gramos)							
Peso al nacimiento (2500-1500)							
Nº de recién nacidos, n (%)	1	(4,5)		14	(41,2)		
Peso al nacimiento (gramos)	2455 ± 40,2		2440 - 2470	1842 ± 180,2		1750 - 2430	
Muy bajo peso al nacimiento (<1500)	1	(4,5)		0	(0)		

^a DET vs eSET (p<0,05). CI, intervalo de confianza

6.2 Resultados obstétricos y neonatales de las parejas eSET y DET según la intención a tratar.

Tuvieron lugar 38 partos en cada uno de los grupos. En el grupo eSET además de los partos según el protocolo (22), se incluyeron 9 partos de las gestaciones espontáneas que ocurrieron después de la aleatorización, un parto de una paciente con tratamiento de criotransferencia (2 embriones transferidos), más 6 partos de las pacientes con sólo un embrión el día de la transferencia en fresco; en total 38 recién nacidos. En el grupo DET además de los partos ocurridos según protocolo (27) se incluyen los 6 partos de las pacientes con gestación espontánea, 3 partos de las pacientes que sólo tuvieron transferencia de embriones vitrificados, un parto de la pacientes con sólo un embrión el día de la transferencia y un parto más de la paciente que quedó embarazada antes de la criotransferencia; en total 38 partos y 46 recién nacidos.

En la tabla 21 se muestran los resultados. Encontramos diferencias significativas en la proporción de parto múltiple (0% en eSET vs 21,1% en DET), sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en el tipo de presentación, comienzo y finalización del parto vaginal y cesárea.

No encontramos diferencias significativas en la semana media gestacional del parto (38.4 ± 2.9 en eSET vs 38.0 ± 2.2 en DET) ni en el peso medio de los recién nacidos, aunque fue ligeramente mayor en el grupo eSET respecto a DET (3097 ± 596 gr vs 2650 ± 423 gr).

La proporción de parto pretérmino en el grupo eSET fue menor que en el grupo DET, no encontrando diferencias significativas (13,2% vs 26,3%).

No se produjo ninguna muerte fetal en ningún grupo.

Tabla 21: Resultados obstétricos y neonatales de las parejas eSET y DET según la intención a tratar.

	eSET			DET			Media de las diferencias (95% CI)
	Media	± SD	Rango	Media	± SD	Rango	
Nº total de recién nacidos	38			46			
Nº total de partos	38			38			
Únicos, n (%)	38	(100)		30	(78,9)		
Múltiples							
Gemelares, n (%)	0	(0)		8	(21,1) ^a		
Triples, n (%)	0	(0)		0	(0)		
Tipo de parto							
Vaginal, n (%)	21	(55,3)		20	(52,6)		
Cesárea, n (%)	17	(44,7)		18	(47,4)		
Semana de gestación media	38,4	2,9	27 - 41	38,0	2,2	29 - 41	-0,5(-2,23;1,38)
Semana gestacional							
Parto a término (≥ 37 semanas gestación), n	33	(86,8)		28	(73,7)		
Nº de recién nacidos, n (%)	33	(86,8)		33	(71,7)		
Edad gestacional (semanas)	39 ± 2,0		37 - 41	38,0 ± 2,1		37 - 41	
Peso al nacimiento (gramos)	3415 ± 470		2500 - 3940	2800 ± 240,3		2100 - 3860	
Parto pretérmino (< 37 semanas gestación), n	5	(13,6)		10	(26,3)		
Nº de recién nacidos, n (%)	5	(13,6)		13	(28,3)		
Edad gestacional (semanas)	35 ± 1,0		34 - 36	35 ± 2,2		33 - 36	
Peso al nacimiento (gramos)	2350 ± 340		1090 - 2470	2289 ± 330,2		1750 - 2900	
Peso medio (gramos)	3097 ± 596		1090 - 3940	2800 ± 477		1800 - 3860	-279(-409,7;-32,1)
Bajo peso al nacimiento (gramos)							
Peso al nacimiento (2500-1500)							
Nº de recién nacidos, n (%)	3	(7,9)		15	(32,6)		
Peso al nacimiento (gramos)	2300 ± 370		2000 - 2470	1800 ± 190,1		1750 - 2430	
Muy bajo peso al nacimiento (<1500)	1	(2,6)		1	(2,2)		

^a DET vs eSET (p<0,05). CI, intervalo de confianza

6.4 Complicaciones que requieren ingreso en las pacientes eSET y DET según protocolo e intención de tratar.

Al analizar las complicaciones que requirieron ingreso hospitalario (riesgo de parto prematuro, ingreso en urgencias durante el embarazo, complicaciones neonatales y de la madre después del parto) encontramos que las mujeres del grupo eSET tuvieron menos complicaciones con respecto a las del grupo DET (4,5% vs 25,9%) según protocolo pero sin diferencias significativas (Tabla 22).

Sin embargo al analizar estas complicaciones según la intención de tratar encontramos diferencias significativas entre ambos grupos (2,7% en eSET versus 18,4% en DET) (Tabla 23).

Tabla 22: Complicaciones que requieren ingreso en las pacientes eSET y DET según protocolo.

	eSET (22 partos)		DET(27 partos)		OR
	n	(%)	n	(%)	(95% CI)
Complicaciones que requieren ingreso	1	(4,5)	7	(25,9)	0,14 (0,02;1,21)
Riesgo de parto prematuro	1	(4,5)	6	(22,2)	
Ingreso hospitalario durante el embarazo	0		7	(25,9)	
Complicaciones neonatales y maternas después del parto	1	(4,5)	5	(18,5)	
Pacientes con un 1 complicación	0		1		
Pacientes con 2 complicaciones	1		1		
Pacientes con 3 complicaciones	0		5		

NS

Tabla 23: Complicaciones que requieren ingreso en las pacientes eSET y DET según la intención a tratar.

	eSET(38 partos)		DET(38 partos)		OR
	n	(%)	n	(%)	(95% CI)
Complicaciones que requieren ingreso	1	(2,7)	7	(18,4) ^a	0,12(0,01;1,03)
Riesgo de parto prematuro	1	(2,7)	6	(15,8)	
Ingreso hospitalario durante el embarazo	0		7	(18,4)	
Complicaciones neonatales y maternas después del parto	1	(2,7)	5	(13,2)	
Pacientes con 1 complicación	0		1		
Pacientes con 2 complicaciones	1		1		
Pacientes con 3 complicaciones	0		5		

^a DETvs eSET (p<0,05)

DISCUSIÓN

Desde que, en 1999, Vilska et al. publicaran el primer eSET por indicación médica, esta estrategia para disminuir la tasa de gestación múltiple se ha ido incorporando en todos los centros de RA del mundo, pero sin ser un procedimiento mayoritario en gran parte de éstos. Existen grandes diferencias entre países, siendo los países noreuropeos los que lideran el ranking en su uso, estando España entre los países con una menor implantación (Maheshwari et al., 2011; Kupka et al., 2014).

La eSET presenta ventajas en términos de resultados obstétricos y neonatales con respecto a DET (Sullivan et al., 2012). Sin embargo, los parámetros de eficacia convencionales utilizados en los centros de FIV, como la tasa de gestación por transferencia, se pueden ver comprometidos, reduciéndose casi a la mitad, si se aplica a pacientes no seleccionadas (van Moonfort et al., 2006).

En la última década, las innovaciones en materia de criopreservación embrionaria, con la aparición de la vitrificación (Tiitinen et al., 2001), han permitido mejorar los resultados de eSET, al expresarlos como tasas de gestación y tasas de nacido vivo acumuladas (Veleva et al., 2009). De este modo se consigue una reducción drástica del embarazo gemelar sin disminuir las posibilidades de gestación dentro del mismo ciclo de tratamiento (Pandian et al., 2013).

Esto ha llevado a que, en los últimos años, se hayan acumulado evidencias que ponen de manifiesto la viabilidad de este abordaje en pacientes seleccionadas (< 36 años y con embriones de buena calidad) (Mc Leron et al., 2010; Pandian et al., 2013). A pesar de estas numerosas evidencias, la baja validez externa de estos estudios no ayudan a la implantación del eSET en muchos países y centros. Esta escasa validez externa se debe a que estos estudios se basan, como hemos comentado previamente, en pacientes con características clínicas muy determinadas, y a que están realizadas en entornos socio-sanitarios muy diversos (Pandian et al., 2013). Esta baja validez externa es uno de los motivos principales esgrimidos por los profesionales para no implantar la eSET (Persperaten et al., 2008a,b).

Por todo lo anterior, y con el objetivo de disponer de evidencias de calidad que permita a las autoridades sanitarias y a los profesionales apostar por el eSET, nos propusimos realizar un ensayo clínico prospectivo aleatorizado, con una adecuada validez externa en nuestro entorno, que comparase la transferencia electiva de

embrión único más criotransferencia de un embrión frente a la transferencia de dos embriones convencional.

1. Tamaño de muestra, criterios de inclusión y diseño del estudio.

El número de pacientes incluidas en nuestro estudio (175) fue similar a la media (200) de pacientes incluidas en los ocho ensayos clínicos aleatorizados publicados hasta la fecha, oscilando entre 53 (Gerris et al., 1999) y 660 pacientes (Thurin et al., 2004).

En el año 2001 se publicaron las recomendaciones para indicar eSET de la European Society of Human Reproduction and Embryology: mujeres < 35 años, en su primer o segundo ciclo de FIV, y que tuvieran embriones de buena calidad (ESRHE Campus Course Report, 2001). Por esto, no es de extrañar que todos los estudios mencionados anteriormente consideraran como criterio de inclusión la edad de la paciente, variando este límite en seis de ellos, desde <30 años (Moustafa et al., 2008) hasta <36 años (Thurin et al., 2004). Sólo dos RCT (van Montfort et al., 2006; Prados et al., 2014) consideraron como criterio de inclusión un límite de edad <38 años.

Por otra parte, todos los estudios, incluidos el de van Montfort et al. (2006) y Prados et al. (2014b), consideraron como criterio de inclusión la presencia de embriones de buena calidad, variando el número desde ≥ 1 (Moustafa et al., 2008) hasta ≥ 4 (Prados et al., 2014b).

Por tanto, nuestro estudio es el primer ensayo clínico prospectivo aleatorizado sobre eSET vs DET, donde sin tener en cuenta el parámetro de calidad embrionaria, se amplía la edad a mujeres menores de 38 años.

Esta decisión se tomó con el propósito de que la extrapolación de nuestros resultados a nuestro entorno permitiera obtener un impacto real, en términos absolutos, en la reducción de embarazos múltiples, pues al ser nuestro centro un hospital público, nuestras parejas tienen unas características diferentes a las de centros privados (Klemetti et al., 2007; Castilla et al., 2009). Si hubiéramos utilizado criterios más restrictivos no hubiéramos podido obtener conclusiones clínicamente

aplicables a nuestros pacientes, pues sería bajo el número de pacientes candidatas a eSET en la práctica diaria.

La tasa de nacido vivo acumulada que incluye las gestaciones logradas después de la transferencia de embriones vitrificados (FET) es el mejor indicador de la eficacia de la técnica de reproducción asistida (TRA), ya que tiene en cuenta a todos los embriones derivados de un ciclo de tratamiento (Veleva et al., 2009). Por esto, se considera de mayor calidad los ensayos clínicos aleatorizados en RA que incluyen los ciclos de FET, como nuestro estudio. Sólo cuatro (Martikainen et al., 2001; Thurin et al., 2004; Moustafa et al., 2008; Prados et al., 2014b) de los ocho RCT existentes sobre eSET reportaron tasa de embarazo acumulada. Pero sólo tres (Thurin et al., 2004; Moustafa et al., 2008; Prados et al., 2014b) realizaron transferencia de embrión único también en ciclo de criotransferencia. De esta manera se pudo reducir la tasa de embarazos múltiples, no sólo en la transferencia en fresco, sino también en las criotransferencias.

Otro RCT con un diseño similar (Martikainen et al., 2001), pero que no mantienen la transferencia de embrión único en la criotransferencia, han obtenido tasas de embarazo múltiple más elevadas que las nuestras en criotransferencias (7,7% vs 0%).

2. Participación de las parejas en el estudio.

En cuanto a la participación de las pacientes en el estudio hemos obtenido una alta tasa de participación en las parejas candidatas, siendo casi de un 97%, y superior a la descrita por varios autores [39% (Gerris e tal., 1999); 11% (Martikainen et al., 2001); 33% (Lukassen et al., 2005); 25% (Thurin et al., 2004) 46% (van Montfoort et al., 2006); 40% (Prados et al., 2014b) lo cual puede deberse a varios motivos. En primer lugar a la implicación del personal de nuestra unidad, los cuales no parecen tener las dos barreras principales que van Peperstraten et al. (2008b) describieron en los profesionales para rechazar el eSET: no valorar los embarazos gemelares como una complicación y percibir el eSET como una amenaza para sus tasas de éxito. Diferentes autores han demostrado la importancia de los profesionales sanitarios en la implantación del eSET (van Perspetraten et al., 2008a; Krewel et al., 2013). Este último autor, demostró que el factor que más influía en la aceptación del

eSET por las pacientes era recibir apoyo y consejo en este sentido por los profesionales del centro.

En segundo lugar, y al igual que el ensayo de van Montfoort et al. (2006) a las parejas se les ofrecía un ciclo extra en el Sistema Sanitario de Salud si aceptaban ser incluidas en el estudio. En el citado trabajo de Kreuwel et al. (2013) este factor fue menos valorado por las pacientes que el apoyo recibido de los profesionales. Sin embargo, políticas similares han sido implantadas en otros sistemas públicos de salud, con gran aceptación por las pacientes (Sundstrom y Saldeen, 2009). Nuestro estudio no permite valorar la aceptación del eSET sin ofrecer un ciclo extra en el Sistema Sanitario de Salud.

3. Resultados de reproducción asistida de las parejas eSET y DET.

Nuestros resultados reflejan que la implantación de una política eSET junto con un programa de criopreservación de embrión único disminuye drásticamente el embarazo múltiple (eSET: 0.0% vs DET: 27.6%), obteniendo una tasa de gestación clínica acumulada superior pero no estadísticamente significativa a la obtenida con un ciclo de DET en mujeres menores de 38 años (eSET: 49.1% vs DET: 46.9%).

Por lo tanto, nuestro estudio es el primer ensayo clínico aleatorizado en confirmar lo sugerido por la American Society for Reproductive Medicine (Practice Committee of the SART and Practice Committee of the ASRM, 2013); según esta sociedad americana con un sistema de vitrificación óptimo que ocasione poco daño a los embriones, las tasa de gestación acumulada, en teoría, debería ser mayor transfiriendo los embriones individualmente. Por tanto, la decisión de crioconservar embriones individualmente debe tener en cuenta el pronóstico, la calidad del embrión, y el éxito del programa de crioconservación. Sin la capacidad de almacenar embriones viables para su uso posterior, la estrategia de eSET sería difícil de mantener.

Nuestros resultados coinciden con los estudios de un diseño similar (Thurin et al., 2004; Moustafa et al., 2008; Prados et al., 2014b). Thurin et al. (2004) dividieron una población de buen pronóstico en dos grupos, obteniendo una tasa de recién nacido vivo de un 42% y un 33% de embarazos gemelares en el grupo en que se

transfirieron dos embriones, mientras que en el grupo que se hizo transferencia única la tasa de recién nacido vivo acumulada fue de un 38%, pero sólo hubo un 1% de gemelares.

En el ensayo clínico de Moustafa et al. (2008) la población seleccionada fueron mujeres con una edad media de 25 años y con al menos un embrión de buena calidad el día de la transferencia; además hicieron un seguimiento durante un año para determinar las tasas de gestación y de nacido vivo acumuladas con los ciclos de criotransferencias en ambos grupos; en el grupo eSET se mantuvo la política de transferir un embrión en los siguientes ciclos de criotransferencia; de este modo no observaron diferencias significativas en la tasa de gestación clínica (37% vs 42,11%) ni de nacido vivo acumuladas (33,3% vs 33,3%) entre eSET y DET respectivamente, siendo la tasa de embarazo gemelar en el grupo eSET del 0% y del 14% en el grupo DET.

En un reciente estudio de Prados et al. (2014b), con pacientes menores de 38 años, obtuvieron una tasa de gestación acumulada en el grupo eSET+eSFET del 63,0% frente al 65,0% del grupo DET, sin embargo en éste la tasa de embarazo múltiple alcanzó el 35,0%; todo esto puede ser debido a que como criterio de inclusión las pacientes debían tener al menos 4 embriones de buena calidad en d+3 o en estadio de blastocisto. Además el 40% de las parejas del grupo eSET se cambiaron al grupo DET el día de la transferencia.

También nuestros resultados coinciden con los resultados de aquellos autores que realizan eSET más criotransferencia de dos embriones (Martikainen et al., 2001). Estos analizaron un total de 144 mujeres, las cuales tenían al menos cuatro embriones de buena calidad, la tasa de gestación clínica acumulada fue similar en ambos grupos (47,3% en eSET vs 58,6% en DET), sin embargo hubo un 5% de gemelares en el grupo eSET y un 39% en el grupo DET.

Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con el estudio de van Montfoort et al. (2006) en el que no se seleccionaron previamente las parejas, encontraron unas tasas significativamente más elevadas tanto de embarazo como de nacido vivo en transferencia de dos embriones (DET) que en eSET. En el grupo de eSET se eliminaba totalmente el riesgo de embarazo múltiple pero disminuyendo casi a la

mitad la tasa de embarazo (40.3% en el grupo de DET versus 21.4% en el de eSET). Pero, si se realizaba eSET sólo en grupos previamente seleccionados por su elevado riesgo de embarazo múltiple (<38 años y con al menos un embrión de buena calidad), la tasa de éste disminuía hasta un 12.9% sin disminuir significativamente la tasa de gestación global.

En nuestro estudio, a pesar de no haber tenido en cuenta la calidad embrionaria como criterio de inclusión, como si lo han hecho la totalidad de trabajos similares, nuestros resultados son comparables. Esto puede deberse a que aproximadamente el 70% eran embriones de buena calidad, lo que probablemente esté relacionado con la buena respuesta ovárica observada en las pacientes. Un estudio finlandés prospectivo no aleatorizado observó que la decisión clínica entre eSET y DET no debe basarse únicamente en la edad de la mujer, sino también en otras características favorables para el pronóstico del ciclo de tratamiento, como por ejemplo una buena respuesta a la estimulación (Niinimaki et al., 2013).

Otra característica que puede haber hecho que a pesar de haber ampliado la edad de las pacientes a < 38 años, nuestros resultados sean similares a los otros estudios más estrictos, es el tener un tiempo medio de esterilidad en nuestras pacientes de 37 meses, cifra muy similar a la reportada en otros RCT sobre eSET (Gerris et al., 1999; Lukassen et al., 2005; Thurin et al., 2004; van Montfoort et al., 2006). Esto se debió a que se consideró como criterio de inclusión un tiempo de esterilidad < 5 años. Son muchos los modelos clásicos (Templeton et al., 1996) y actuales (Arvis et al., 2012; van Loendersloot et al., 2012; teVelde et al., 2014) que consideran a este factor con influencia negativa significativa en el pronóstico del resultado de los ciclos de FIV. Otro factor que puede explicar los buenos resultados obtenidos a pesar de la mayor edad de nuestras pacientes sería la exclusión de mujeres con alto índice de masa corporal, ya que como han demostrado Sifer et al. (2014), mujeres con IMC mayor de 30kg/m² presentan peores resultados en programas de eSET.

En nuestro estudio la tasa de aborto en eSET fue del 21.4%, el cual es ligeramente superior a los datos publicados en estudios similares con mujeres más jóvenes (15,5-16,8%) (Martikainen et al., 2001; Thurin et al., 2004). Estas diferencias pueden deberse a que como ya hemos comentado nuestras pacientes eran de más edad. No obstante las tasas de aborto son menores a las esperadas en un grupo de

mujeres de ese rango de edad (Nyboe Andersen et al., 2000) lo cual puede deberse a los criterios de inclusión de buen pronóstico usados en nuestro estudio de eSET. Así, se ha comprobado que la buena respuesta ovárica, valorada en nuestro estudio por la media de ovocitos obtenidos (10,6 ovocitos/punción), y la ausencia de anomalías uterinas, se asocia con una menor tasa de aborto (Sunkura et al., 2014). Por lo tanto, aunque la posibilidad de un parto en mujeres gestantes de más edad se reduce en comparación con las mujeres más jóvenes (Engmann et al., 2001), otros criterios de selección de pacientes usados en nuestro estudio han permitido obtener mejores resultados.

Las conclusiones obtenidas en el análisis según protocolo fueron similares a las obtenidas en el análisis según la intención a tratar; resultados similares fueron obtenidos por Thurin et al. (2004) que utilizó estos dos enfoques pero en mujeres menores de 36 años y con embriones de buena calidad. Con este tipo de análisis por intención a tratar se pretende analizar los resultados considerando a todos los individuos admitidos al estudio, de acuerdo al grupo al cual fueron asignados originalmente, aunque no hayan cumplido con el protocolo. Esto permite mantener hasta el final del estudio el objetivo perseguido con la aleatorización: mantener el equilibrio entre factores pronósticos conocidos y desconocidos, disminuyendo la probabilidad de sesgar los resultados. En el análisis según intención de tratar, no todos los pacientes asignados a recibir una intervención realmente la reciben, siendo el seguimiento de los pacientes incompleto, es decir, se desconoce si ocurrió o no el resultado de interés en algunos de los pacientes incluidos en el estudio.

A pesar de los beneficios comentados del análisis por intención de tratar, nosotros analizamos nuestros datos también por protocolo, pues en ensayos clínicos que evalúan efectos adversos (embarazos múltiples) de una intervención (transferencia embrionaria), como es nuestro estudio, estos efectos adversos podrían quedar diluidos al considerar pacientes que no han recibido la intervención, como sucede en el análisis por intención de tratar (Fergusson et al., 2002).

Nosotros hemos seguido las recomendaciones de varios autores (Agostino et al., 2003; Brittain et al., 2005; Piaggio et al., 2006; Dasgupta et al., 2010) para los estudios de no inferioridad, como el nuestro, los cuales recomiendan para este tipo de estudios realizar ambos tipos de análisis. De este modo, en caso de obtener

conclusiones similares en ellos, como sucede en nuestro caso, se aumenta la robustez de las mismas.

4. Resultados de la vitrificación embrionaria

El éxito de los programas de vitrificación está influenciado por muchas variables, especialmente la supervivencia embrionaria y el posterior desarrollo de embriones en cultivo. Las tasas de supervivencia (88,1%) y de división embrionaria después de la desvitrificación (70,2%) observadas en nuestro estudio son consistentes con las descritas en otros estudios con programas de vitrificación de embriones en ovocitos propios, tanto para la supervivencia (85,5 - 94,2%) (Cobo et al., 2012; Rama et al., 2005; Li et al., 2007; Wang et al., 2012) como para la división embrionaria (61,4 - 78%) (Zhang et al., 2012; Desai et al., 2007). Estas altas tasas son de vital importancia para determinar el éxito de los programas de criotransferencia.

Existen grupos que defienden el uso de la eSET en ciclos de criotransferencia. Hyden-Granskog et al. (2005) no encontraron diferencias significativas en la tasa de nacidos vivos entre eSET y DET en criotransferencias (28.6% y 25.7% respectivamente), por lo que concluyeron que sería una estrategia adecuada para reducir la tasa de embarazo múltiple. Nuestros resultados de tasa de nacido vivo sólo en los ciclos de criotransferencias (21,6%) son algo menores a los de estos autores pero superiores a los obtenidos por Nakagawa et al. (2010). Nuestros resultados inferiores respecto a Hyden-Granskog et al. (2005) pueden deberse a los criterios utilizados por estos autores, que realizaron eSFET cuando dos o tres embriones eran criopreservados en el mismo dispositivo y más de un embrión cumplía con los criterios para la transferencia después de la descongelación; en todos los casos, se seleccionó un embrión con una tasa de supervivencia de al menos el 75%, y si era posible el resto de embriones eran revitrificados. Nuestros resultados superiores respecto a Nakagawa et al. (2010), pueden ser debidas al protocolo de estimulación utilizado en este estudio (77% de las pacientes son tratadas con citrato de clomifeno) que no permite una adecuada selección embrionaria previa a la criopreservación (Ragni et al., 2012).

Como hemos comentado, al comparar nuestro diseño con el de otros autores, las tasas publicadas de embarazos gemelares en eSET más criotransferencias de dos embriones suelen ser bajas (Martikainen et al., 2001) pero para conseguir una tasa cercana al cero se deben realizar transferencias de un solo embrión en ciclos de criopreservación (Pandian et al., 2013).

Nosotros pensamos que nuestra alta tasa de gestación clínica acumulada (49,1%) y de nacido vivo (38,6%) en eSET puede ser explicada por la efectividad de la técnica de vitrificación. Ésta supuso un incremento relativo de la tasa de gestación por ciclo del 40%, cifra parecida a la reportada en un reciente estudio similar realizado en Japón (36,8%) (Ishihara et al., 2014). Este incremento confirmaría el modelo predictivo publicado por Roberts et al. (2011), basado en los resultados de cinco centros en Reino Unido, y que permite la predicción simultánea de los resultados de la transferencia de dos embriones (DET) y de un embrión (eSET). Este modelo se aplicó a los diferentes casos utilizando eSET, tanto en ciclos en fresco como en tratamientos completos incluyendo criotransferencias, concluyendo que el porcentaje de recién nacido aumentaría en eSET con estos ciclos completos, llegando a ser la tasa de recién nacido con eSET más criotransferencia muy similar a la tasa con DET, añadiendo que el buen resultado de eSET depende de una alta tasa de viabilidad de los embriones crioconservados.

Sutter et al. (2002) desarrollaron un modelo para estimar el ahorro que supone la aplicación de criotransferencia de embrión único en programas de eSET, según la eficacia de las criotransferencias. Tomando la tasa de gestación por criotransferencia obtenida en nuestro estudio (24,3%), el ahorro por niño tras eSET+eSFET comparado con DET, sería alrededor del 12%.

Es necesario realizar estudios prospectivos amplios que confirmen estos buenos resultados de gestación en eSFET dado el papel tan relevante en los últimos años de las criotransferencias en RA. Según el último informe de RA en Europa (Kupka et al., 2014), alrededor del 30% de los embriones obtenidos tras FIV son criopreservados. Las criotransferencias alcanzan el 22% de la actividad en los centros de RA en Europa y hasta el 31% en Japón (Ishihara et al., 2014). En España, casi el 20% de los embarazos de FIV se logra mediante criotransferencia (Prados et al., 2014a).

5. Resultados de las pacientes excluidas pre y post aleatorización.

Nuestros resultados demuestran que los criterios utilizados para la selección de pacientes de buen pronóstico son adecuados. No sólo por los resultados obtenidos en tasas de gestación, ya comentadas, sino por el análisis de las parejas excluidas del estudio pre y post aleatorización.

En el grupo excluido post aleatorización observamos una alta tasa de gestación espontánea (27.8%) desde la aleatorización hasta el inicio del ciclo de estimulación, debido a la existencia en nuestro centro de una lista de espera con un tiempo de demora medio de 6 meses. Dangen et al. (2010) relacionó altas tasas de gestación mientras comienza el ciclo de TRA con buen pronóstico reproductivo. En el estudio de Thurin et al. (2004) la tasa de gestación espontánea fue mucho menor, ya que éstas se produjeron entre el ciclo en fresco y el ciclo de congelados.

Otro resultado que nos habla en este sentido, es que en el grupo de pacientes que solo tuvieron un embrión para transferencia, y por tanto fueron excluidas del análisis, se les realizó transferencia única obligada (cSET); obteniendo una tasa de gestación clínica por transferencia del 60%.

Nuestros resultados de gestación clínica por transferencia en parejas de cSET son mejores que los obtenidos en este grupo de pacientes en estudios similares (14-19%) (Vilska et al., 1999; Tiitinen et al., 2003; Martikainen et al., 2001; Veleva et al., 2006). Estas diferencias pueden deberse a que en nuestro estudio en la mayoría de estas parejas (93.3%) el único embrión que se transfiere fue de buena calidad (Straughen et al., 2013). Desconocemos estos datos en los trabajos comentados anteriormente.

Otro dato a destacar fue la alta tasa de embarazo gemelar (60%) obtenida en el grupo de pacientes que no aceptaron participar y se les realizó la transferencia de dos embriones.

6. Resultados de las complicaciones que requieren ingreso.

En el presente estudio hemos recogido las complicaciones que requirieron ingreso (riesgo de parto prematuro, ingreso en urgencias durante el embarazo y complicaciones neonatales y puerperales) siendo en el grupo eSET de un 2,7% vs 18,4% en el grupo DET en el análisis de intención a tratar, ya que la tasa de embarazo múltiple en el grupo DET fue estadísticamente significativa que en el grupo eSET, además las pacientes del grupo DET tuvieron de media más de una complicación, incluso una misma paciente pudo llegar a sufrir las tres, por lo tanto acudieron en mayor número de ocasiones al hospital.

La frecuencia de las complicaciones analizadas depende de la edad maternal. En embarazos únicos, el riesgo de preeclampsia aumenta un 30% por cada año adicional a partir de los 34 años (Saftlas et al., 1990) y es tres veces mayor en la presencia de un embarazo gemelar (Duckitt and Harrington, 2005). La diabetes gestacional también es más frecuente en las mujeres mayores de 35 años (Xiong et al., 2001), y la incidencia aumenta aún más en los casos de embarazo múltiple (Walker et al., 2004). Por ello, algunos autores han recomendado la eSET en mujeres de mayor edad para disminuir el riesgo de complicaciones (Veleva et al., 2006; Niinimäkii et al., 2013).

7. Limitaciones del estudio

Los resultados obtenidos en el presente estudio están limitados por los métodos de selección embrionaria utilizados, pues la tasa de éxito en programas de FIV depende en gran parte de la calidad embrionaria. Nuestro estudio podría haberse complementado mediante una mejor selección embrionaria utilizando un sistema de time-lapse (Kaser and Racowsky, 2014). Actualmente, nuestro grupo está realizando una investigación encaminada a analizar la utilidad de estas nuevas tecnologías en programas de eSET.

Otra de las limitaciones de nuestro estudio fue que tras la desvitrificación no se realizó cultivo hasta blastocisto, lo cual se ha demostrado como un método de mejora de las tasas de embarazo en programas de criotransferencias (Shapiro et al., 2013; Mckenna et al., 2013).

Creemos que la incorporación de estos protocolos mejoraría considerablemente el rendimiento de los programas de eSET. No obstante, la incorporación de este procedimiento obligaría a planificar adecuadamente el número de embriones vitrificados en cada dispositivo para evitar posteriores revitrificaciones embrionarias. Kumasako et al. (2008) demostró que aunque los embriones revitrificados tienen una menor tasa de supervivencia, la tasa de embarazo y parto por criotransferencia es similar a los embriones que se han vitrificado una sola vez.

Además, nuestro estudio fue doble ciego sólo hasta el día de la transferencia embrionaria para ginecólogos y pacientes, con el objetivo de que la pertenencia a un brazo del estudio no influyera en la estimulación ovárica. Únicamente el Embriólogo conocía el grupo al que pertenecían las parejas durante todo el estudio.

Con los resultados de nuestro estudio no podemos generalizar la vitrificación de todos los embriones del ciclo. Actualmente empieza a haber evidencias que apoyan no realizar transferencia de embriones en fresco y por tanto vitrificar todos los embriones y transferirlos en ciclos posteriores (transferencia diferida). De esta manera se evita el efecto deletéreo de la estimulación de la ovulación sobre el endometrio. Este cambio de política de transferencia ha sido posible por la mejora en las técnicas de crioconservación (Aflatoonian et al., 2010; Shapiro et al., 2011; Cobo et al., 2012). Sin embargo, una reciente revisión de Shapiro et al. (2014) donde se comparan los datos de transferencia en fresco y vitrificados demuestra resultados no concluyentes. Por esto, a pesar del buen rendimiento de nuestro programa de vitrificación creemos que antes de generalizar las transferencias diferidas son necesarios más RCT, ya que, como en nuestro estudio, muchos de los trabajos donde esta técnica se ha realizado son pacientes de buen pronóstico (Maheshwari and Bhattacharya, 2013).

Los resultados de nuestro estudio no se pueden extrapolar a las pacientes que reciben embriones procedentes de ovocitos de donante. Un estudio retrospectivo de Clua et al. (2012) puso en evidencia que las pacientes incluidas en programas de ovodonación y con al menos tres embriones de buena calidad llegan a alcanzar tasas de nacido vivo acumuladas del 76,4% con una estrategia eSET frente al 63,7% en DET y evitando el embarazo múltiple (0% en eSET vs 40% en DET). Otros autores

reportaron datos similares en ciclos de ovodonación (Criinitti et al., 2005; Stillman et al., 2009).

8. Implantación de la eSET en el sistema sanitario público.

Aunque el tema del coste-efectividad de la técnica no ha sido objetivo de nuestro estudio, queremos destacar una revisión sistemática realizada por Fiddelers et al. (2007), que fue diseñada para evaluar la política más coste-efectiva comparando eSET frente a la transferencia de dos embriones (DET). Esta evaluación económica incluyó cuatro estudios: uno observacional (Gerris et al. 2004) y tres ensayos clínicos aleatorizados (Fiddelers et al. 2006; Kjellberg et al. 2006; Lukassen et al. 2005). El grupo SET recibió un solo ciclo fresco (Fiddelers et al. 2006; Gerris et al., 2004), dos ciclos frescos (Lukassen et al., 2005), o un ciclo fresco seguido de criotransferencia de embrión único (Kjellberg et al., 2006). Estos autores concluyeron que DET fue la estrategia más costosa -a costa de una mayor tasa de embarazos múltiples-, si bien resultó más efectiva cuando la intervención de eSET incluía un único ciclo fresco. Por otro lado, eSET se prefería desde el punto de vista coste-efectivo, si se realizaba en pacientes con buen pronóstico o si se incluía un segundo ciclo de embriones congelados/descongelados. Cuando estos últimos se excluyen, la elección entre eSET y DET dependía del coste adicional que la sociedad estuviera dispuesta a pagar por un embarazo exitoso.

La mayoría de estudios sobre coste-efectividad incluyen a mujeres jóvenes y de buen pronóstico (Tabla 10, Introducción). Estudios futuros deben incluir a mujeres de mayor edad (por encima de 38 años), con ciclos de FIV/ICSI fallidos anteriormente o falta de embriones de buena calidad. También son necesarios los análisis de coste-efectividad a largo plazo, que consideraran el coste relacionado con los nacimientos múltiples y también el coste de la criopreservación.

En nuestro entorno, al igual que en otros sistemas sanitarios públicos de otros países, es difícil implantar la política de eSET. Las dificultades son ya conocidas: la creencia en que se puede ver comprometida la tasa de embarazo, la presión por la limitación en el número de ciclos en los centros públicos y la percepción positiva de la pareja sobre el embarazo múltiple, que con un solo ciclo pueden conseguir el número definitivo de hijos (Hojgaard et al., 2007).

Otro factor muy importante a tener en cuenta es que las preferencias de las pacientes por un embrión ó dos no son estables durante el tratamiento. Newton et al. (2013) estudiaron dichas preferencias en una clínica canadiense, encontrando que al principio del ciclo las pacientes percibían las transferencias embrionaria múltiple como más peligroso que al final del ciclo. Según Fiddlers et al. (2011) las preferencias en TE también cambian entre los diferentes ciclos, de modo que las pacientes que reciben eSET y quedan embarazadas siguen prefiriendo eSET, mientras que las que no quedan embarazadas con eSET prefieren DET en el siguiente ciclo.

Otro reciente estudio que habla en este sentido (Stillman et al., 2013) pone de manifiesto que la autonomía del paciente en la toma de decisiones del número de embriones transferir se puede ver afectada por diferentes factores, como son el apoyo gubernamental ó los programas de seguros o garantía de reembolso; las pacientes sin este tipo de recursos optan por transferir mayor número de embriones para maximizar la probabilidad de embarazo y no tener que hacer frente a una importante carga económica de un segundo ciclo. Por el contrario, hay una mayor elección de SET si la pareja no tiene q hacerse responsable de otro tratamiento ya sea a través de una cobertura de seguros (Coetzee et al ., 2007; Stillman et al., 2009) ó por un programa de reembolso (Stillman et al., 2009). Una innovación introducida recientemente por un proveedor de seguros en EEUU es que si un paciente decide SET, el ciclo de criotransferencia posterior, si es necesario, será un beneficio cubierto (Rosenthal et al., 2013).

Por otro lado, las tasas de eSET varían notablemente entre los distintos países. Es importante señalar que además de razones clínicas, sociales y económicas para explicar este fenómeno (Maheshwari et al., 2011), el escenario normativo de cada país es importante, dado que en aquellos países en los que la legislación limita el número de embriones a transferir, tanto los pacientes como los clínicos aceptan mejor la transferencia única electiva (van Peperstraten et al., 2008; Maheshwari et al., 2011).

En España la media de embriones transferidos fue de 2 en 2010, la tasa de SET se encuentra en un 17,4% y la tasa de DET en un 69,5% (Kupka et al., 2014). Sin embargo, en países del Norte de Europa el panorama no es tan desalentador. Algunos países como Noruega, Suecia, Bélgica ó Cánada financian los ciclos solo si se realiza eSET, conscientes del importante ahorro económico y social.

En Suecia se implantó en 2004 una política de transferencia en la que se favorecía la eSET en parejas de buen pronóstico. Actualmente los criterios que se siguen en este país para realizar eSET son bastantes amplios: mujeres menores de 38 años, con buena calidad embrionaria y en sus dos primeros ciclos. Esta política ha resultado en una tasa de SET de un 73,3% (Kupka et al., 2014).

La legislación belga (1 de julio de 2003) con el reembolso de seis ciclos en TRA y la limitación del número de embriones a transferir a uno, no tuvo un impacto negativo en la tasa de gestación acumulada por ciclo, reduciendo sin embargo el embarazo múltiple del 24% al 12%. (Peeraer et al., 2013).

En agosto de 2010, el gobierno provincial de Québec, presentó la financiación de 6 tratamientos de reproducción asistida a través del programa de salud provincial. Junto a este beneficio, se introdujo una legislación para controlar las actividades de los tratamientos de reproducción asistida en la provincia, incluyendo las restricciones sobre el número de embriones que podían transferirse en un ciclo. El objetivo del programa era la transferencia de un embrión en cada ciclo; transfiriéndose más de uno en condiciones subóptimas y con justificación médica (Bissonette et al., 2011). Tres años después de la introducción de esta política la tasa de embarazo múltiple se ha reducido de un 25,8% en 2009 a un 1,6% (Vélez et al., 2013); además de una reducción del coste de los recién nacidos por TRA (Vélez et al., 2014).

Por lo tanto, estas diferencias en la aceptación de eSET con nuestro país es probable que persistan a menos que se produzcan cambios importantes en los aspectos de financiación y legislación de las TRA.

Queremos hacer notar que a nivel autonómico, los resultados de nuestro estudio han llevado a la consejería de salud de Andalucía a instaurar políticas de promoción de eSET, pues sólo se oferta un tercer ciclo a aquellas parejas que en

alguno de sus dos ciclos anteriores hayan optado por eSET en fresco o criotransferencia. De esta manera, nuestra comunidad se suma a los comentados países europeos con políticas públicas activas para reducir la plaga del embarazo múltiple tras TRA (GUIA SAS, 2013). Consideramos que políticas similares deberían instalarse en España.

CONCLUSIONES

1. La política de eSET más criotransferencia de embrión único no disminuye la tasa de gestación clínica acumulada, ni la tasa de nacido vivo acumulada, permitiendo reducir drásticamente las tasas de gestación gemelar, siempre que se aplique a una población seleccionada.
2. Se pueden ampliar los criterios de inclusión en eSET aumentando la edad de la paciente y siendo menos restrictivo con la calidad embrionaria siempre que se aplique a parejas de buen pronóstico y se disponga un programa de vitrificación óptimo.
3. Al ser nuestros criterios de inclusión más amplios que los descritos en estudios previos, creemos que nuestros resultados facilitan la implantación de programas de eSET en la práctica diaria del sistema sanitario público.
4. Es necesario tener en cuenta los resultados de las criotransferencias embrionarias, no sólo para valorar los éxitos en términos de nacidos vivos por ciclo, sino también para considerar las complicaciones de un ciclo de FIV.
5. La planificación previa del número de embriones a vitrificar en cada dispositivo es fundamental para aumentar el número de criotransferencias de un embrión.
6. La aceptación de políticas de eSET por las pacientes son altas cuando se incentiva con un aumento del número de ciclos de tratamiento, lo que debería ser tenido en cuenta por las autoridades sanitarias al legislar sobre eSET.

BIBLIOGRAFÍA

- Absalan F, Ghannadi A, Kazerooni M. Reproductive outcome following thawed embryo transfer in management of ovarian hyperstimulation syndrome. *J Reprod Infertil.* 2013;14:133-137.
- Adashi EY, Barri PN, Berkowitz R, Braude P, Bryan E, Carr J, et al. Infertility therapy-associated multiple pregnancies (births): an ongoing epidemic. *Reprod Biomed Online.* 2003;7:515–542.
- Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L. Can fresh embryo transfers be replaced by cryopreserved-thawed embryo transfers in assisted reproductive cycles? A randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27:357-363.
- Aguilar J, Motato Y, Escribá MJ, Ojeda M, Muñoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online.* 2014;28:475-484.
- Al-Hasani S, Ozmen B, Koutlaki N, Schoepper B, Diedrich K, Schultze-Mosgau A. Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing?. *Reprod Biomed Online.* 2007;14:288-293.
- Alikani M and Cohen J. Patterns of cell fragmentation in the human embryo. *J Assist Reprod Genet.* 1995;12:28s.
- Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod.* 2000;15:2634-2643.
- Alter L, Boitrelle F, Sifer C . Comment sélectionner aujourd'hui le meilleur embryon à transférer?. *Gynecol Obstet Fertil.* 2014;42:515-525.
- Amann RP. Evaluating testis function non-invasively: how epidemiologist-andrologist teams might better approach this task. *Hum Reprod.* 2010;25:22-28.
- Antczak M and Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod.* 1999;14:429-447.

- Aragonés M, Herrero R, Cabañes I, Mifsud A, de Pablo J and Mínguez Y. Biopsia Embrionaria. En: Remohí J, editor. Manual práctico de reproducción humana. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España; 2004. p. 483-491.
- Arday M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa MJ, Herrero R, Moreno JM et al. En: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). Cuadernos de embriología clínica. II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Madrid: 2008.
- Arvis P, Lehert P, Guivarc'h-Levêque A. Simple adaptations to the Templeton model for IVF outcome prediction make it current and clinically useful. Hum Reprod. 2012;27:2971-2978.
- Aston KI, Peterson CM, Carrell DT. Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. Reproduction. 2008;136:377-386.
- Avery S and Brinsden PR. Making the best use of human embryos. J Assist Reprod Genet. 1999;16:457-459.
- Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. Hum Reprod. 2012;27: 2649-2657.
- Balaban B and Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. Reprod Biomed Online. 2006;12:608-615.
- Balaban B, Yakin K, Urman B. Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. Fertil Steril. 2006;85:559-563.
- Balakier H and Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. Hum Reprod. 1997;12:800-804.
- Bamforth F, Machin G. Why zygosity of multiple births is not always obvious: an examination of zygosity testing requests from twins or their parents. Twin Res. 2004;5:406-411.
- Basile N, Morbeck D, García-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocyte. Human Reprod. 2013;28:634-641.

- Bergh C. Single embryo transfer: a mini-review. *Hum Reprod* 2005;20:323-327.
- Bissonnette F, Phillips SJ, Gunby J, Holzer H, Mahutte N, St-Michel P, et al. Working to eliminate multiple pregnancies: a success story in Quebec. *Reprod Biomed Online* 2011;23:500– 504.
- Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;17:CD002118.
- Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ, Fauser BC, Heijnen CJ, Macklon NS. Ovarian stimulation for in vitro fertilization alters the intrauterine cytokine, chemokine, and growth factor milieu encountered by the embryo. *Fertil Steril*. 2010;94:1764-1768.
- Bras M, Lens J, Piederiet M, Rijnders P, Verveld M. *IVF Lab. Laboratory Aspects of In Vitro Fertilization*. Amsterdam: Organon; 1996.
- Brittain E, Lin D. A comparison of intent-to-treat and per-protocol results in antibiotic non-inferiority trials. *Stat Med*. 2005;24:1-10.
- Bruna I, Pérez F, Tur R, Ricciarelli E, De la Fuente A, Monzó A, et al. Embarazo múltiple derivado de FIV-ICSI en España: incidencia y criterios sobre la transferencia embrionaria. *Rev Iber Fert*. 2005;22:99-110.
- Bukulmez O and Arici A. Assessment of ovarian reserve. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2004;16:231-237.
- Cabello Y, Gómez-Palomares JL, Castilla JA, Hernández J, Marqueta J, Pareja A, et al. Impact of the Spanish Fertility Society guidelines on the number of embryos to transfer. *Reprod Biomed Online*. 2010;21:667-675.
- Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online*. 2013;26:477-485.
- Castilla JA and Magán R. *Seguridad Biológica en laboratorio de Reproducción Asistida. Aula de Formación en Embriología Clínica. Nº 4. Albolote (Granada): Gráficas Fernando; 2003.*

- Castilla JA, Hernandez E, Cabello Y, Navarro JL, Hernandez J, Gomez JL, et al. Assisted reproductive technologies in public and private clinics. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:872-878.
- Castilla JA, Ruiz de Assín R, Gonzalvo MC, Clavero A, Ramírez JP, Vergara F, et al. External quality control for embryology laboratory. *Repro BioMed Online*. 2010; 20:68-74.
- Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine (ASRM), Society for Assisted Reproductive Technology (SART). assisted reproductive technology success rates: national summary and fertility clinic reports 2009. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2011.
- Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C, et al. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30:703-710.
- Chambers GM and Ledger W. The economic implications of multiple pregnancy following ART. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2014;19:254-261.
- Chambers GM, Illingworth PJ, Sullivan EA. Assisted reproductive technology: public funding and the voluntary shift to single embryo transfer in Australia. *Med J Aust*. 2011;195:594-598.
- Chavez S, Loewke K, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four- cell stage. *Nat Commun*. 2012;3:1251.
- Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertil Steril*. 2013; 99:1035-1043.
- Chow JS, Benson CB, Racowsky C, Doubilet PM, Ginsburg E. Frequency of a monochorionic pair in multiple gestations: relationship to mode of conception. *J Ultrasound Med*. 2001;20:757-760.

- Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahceci M. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril*. 2006;85:358-365.
- Clavero A, Gonzalvo MC, Castilla JA. Aula de Formación en Embriología Clínica nº 7. Reflexiones sobre evaluación de donantes de gametos y embriones. Granada: Gráficas Fernando; 2007.
- Clua E, Tur R, Coroleu B, Boada M, Rodríguez I, Barri PN. Elective single-embryo transfer in oocyte donation programmes: Should it be the rule?. *Reprod Biomed Online*. 2012;25:642-648
- Cobo A, de los Santos MJ, Castelló D, Gámiz P, Campos P, Remohí J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril*. 2012;98:1138-1146.
- Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocyte vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril*. 2007;89:1657-1664.
- Cobo A, Pérez S, De los Santos MJ, Zulategui J, Domingo J, Remohí J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:350-359.
- Coetzee K, Stewart B, Peek J, Hutton JD. Acceptance of single-embryo transfer by patients. *Fertil Steril* 2007;87:207–209.
- Conolly MP, Hoorens S, Chambers GM; ESRHE Reproduction and Society Task Force. The costs and consequences of assisted reproductive technology: an economic perspective. *Hum Reprod*. 2010;16:603-613.
- Cooper TG, Keck C, Oberdieck U, Nieschlag E. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Hum Reprod*. 1993;8:1251-1258.

- Correa-Perez JR, Fernandez-Pelegrina R, Aslanis P, Zavos PM. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrostermia. *Fertil Steril*. 2004;81:1148-1150.
- Criniti A, Thyer A, Chow G, Lin P, Klein N, Soules M. Elective single blastocyst transfer reduces twin rates without compromising pregnancy rates. *Fertil Steril*. 2005;84:1613–1619.
- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell división in human cleavage- stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Repro Biomed Online*. 2012; 25:371-381.
- Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1986;3:284-295.
- D'Agostino RB, Massaro JM, Sullivan LM. Non-inferiority trials: Design concepts and issues - the encounters of academic consultants in statistics. *Stat Med*. 2003;22:169-186.
- Dal canto M, Coticchio G, Mignini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, et al. Cleavage kinetics análisis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Repro Biomed Online*. 2012; 25:474-480.
- Dasgupta A, Lawson KA, Wilson JP. Evaluating equivalence and noninferiority trials. *Am JHealth Syst Pharm*. 2010;67:1337-1343.
- Davis LB, Lathi RB, Westphal LM, Milki AA. Elective single blastocyst transfer in women older than 35. *Fertil Steril*. 2008;89:230–231.
- De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril*. 2004;82:57-65.

- De Neubourg D, Gerris J, Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M. Impact of a restriction in the number of embryos transferred on the multiple pregnancy rate. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;124:212-215.
- De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, et al. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod.* 2002;17:2402-2409.
- De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996;11:595-597.
- De Sutter P, Gerris J, Dhont, M. A health-economic decision-analytic model comparing double with single embryo transfer in IVF/ICSI. *Hum Reprod.* 2002; 17:2891-2896.
- 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;6:464-469.
- Debrock S, Spiessens C, Meuleman C, Segal L, de Loecker P, Meeuwis L, et al. 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;83:1572–1574.
- Decler W, Osmanagaoglu K, Meganck G, Devroey P. Slightly lower incidence of ectopic pregnancies in frozen embryo transfer cycles versus fresh in vitro fertilization-embryo transfer cycles: a retrospective cohort study. *Fertil. Steril.* 2014;101:163-165.
- Dennis SJ, Thomas MA, Williams DB, Robins JC. Embryo morphology score on day 3 is predictive of implantation and live birth rates. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:171–175.
- Derom R, Derom C, Vlietinck R. The risk of monozygotic twinning. En Blickstein I and Keith LG (eds). *Iatrogenic Multiple Pregnancy: Clinical Implications.* Parthenon Publishing, 2001.p. 9-19.

- Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, Goldfarb J. Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births. *Reprod BioMed Online*. 2007;14:208-213.
- DeSutter P, Gerris J, Dhont M. A health-economic decision-analytic model comparing double with single embryo transfer in IVF/ICSI. *Hum Reprod*. 2002;17:2891-2896.
- Devroey P, Polyzos NP, Blockeel C. An OHSS free clinic by segmentation of IVF treatment. *Hum Reprod*. 2011;26:2593–2597.
- Dixon S, Faghieh Nasiri F, Ledger WL, Lenton EA, Duenas A, Sutcliffe P, et al. Cost-effectiveness analysis of different embryo transfer strategies in England. *BJOG*. 2008;115:758–766.
- Dowling-Lacey D, Jones E, Mayer J, Bocca S, Stadtmauer L, Oehninger S. Elective transfer of two embryos: reduction of multiple gestations while maintaining high pregnancy rates. *J Assist Reprod Genet*. 2007; 24:11-15.
- Doyle P. The outcome of multiple pregnancy. *Hum Reprod*. 1996;11:118-120.
- Duckitt K and Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BJM*. 2005;12:330-565.
- Edwards RG and Brody SA. Principles and practice of assisted human reproduction. Philadelphia (USA): W.B. Saunders Company Published; 1995.
- Ellis NJ, Saboda K, O'Connor J, Nasca PC, Staner EJ, Boyle C. A prospective study of early pregnancy loss. *Hum Reprod*. 1996;11:406-412.
- Engmann L, Maconochie N, Tan SL, Bekir J. Trends in the incidence of births and multiple births and the factors that determine the probability of multiple birth after IVF treatment. *Hum Reprod*. 2001;16:2598-2605.
- Esfandiari N, Kapoor M, Burjaq H, Chang P, Gotlieb L, Casper RF. Monozygotic twins in infertile patients with advanced maternal age: case reports and review of the literature. *Fertil Steril* 2009;92:1168.e9–1168.e12.

- ESHRE Capri Workshop Group. Intrauterine insemination. *Hum Reprod Update*. 2009;15:265-277.
- ESHRE. Comparative Analysis of Medically Assisted Reproduction in the EU: Regulation and Technologies. Grimbergen: European Society of Human Reproduction and Embryology;2009.
- ESHRE. ESHRE Campus Course Report: Prevention of twin pregnancies after IVF/ICSI by single embryo transfer. *Hum Reprod*. 2001;16:790-800.
- Fergusson D, Aaron SD, Guyatt G, Hébert P. Post-randomisation exclusions: The intention to treat principle and excluding patients from analysis. *BMJ*. 2002;325:652–654.
- Fiddellers A, Severens J, Dirksen C, Dumoulin J, Land J, Evers, J. Economic evaluations of single versus double-embryo transfer in IVF. *Hum. Reprod*. 2007;13:5-13.
- Fiddellers AA, Dirksen CD, Dumoulin JCM, van Montfoort PA, Land JA, Janssen JM, et al. Cost-effectiveness of seven IVF strategies: results of a Markov decision-analytic model. *Hum Reprod*. 2009;24:1648–1655.
- Fiddellers AA, Nieman HM, Dumoulin CM, van Montfoort PA, Land A, Evers LH, et al. During IVF treatment patient preferences shift from singletons towards twins but only a few patients show an actual reversal of preference. *Hum Reprod*. 2011;26:2092-2100.
- Fiddellers AA, van Montfoort AP, Dirksen CD, Dumoulin JC, Land JA, Dunselman GA, et al. Single versus double embryo transfer: cost-effectiveness analysis alongside a randomized clinical trial. *Hum Reprod*. 2006;21:2090–2097.
- Fréour T, Pharm D, Dessolle L, Lammers J, Lattes S, Barrière P. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil Steril*. 2013;99:1944-1950.
- Galán A, Campos P, Blanco C, Salinas R, Pérez S, Cobo A. Inseminación de los ovocitos. En: Remohí J. Manual práctico de reproducción humana. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España, 2004.p.358-361.

- García-Malpartida F. Repercusiones sociosanitarias derivadas de la aplicación de técnicas de reproducción asistida en Extremadura [Tesis Doctoral]. Badajoz: Univesidad de Extremadura; Facultad de Medicina; 2011.
- Gardner D, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: toward a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2000;73:1155–1158.
- Gardner D, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril*. 2001;76:1175–1180.
- Gardner D, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril*. 2004;81:551-555.
- Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, et al. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes?. *Hum Reprod*. 1999;14:2588-2595.
- Gelbaya A, Tsoumpou I, Nardo LG. The likelihood of live birth and multiple birth after single versus double embryo transfer at the cleavage stage: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2010;94:936–945.
- Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K, Van Royen E, Van de Meerssche M, Valkenburg M. Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Hum Reprod*. 1999;14:2581-2587.
- Gerris J, de Neubourg D, Mangelschots K, van Royen E, Vercruyssen M, Barudy-Vasquez J, et al. Elective single day 3 embryo transfer halves the twinning rate without decrease in the ongoing pregnancy rate of an IVF/ICSI programme. *Hum Reprod*. 2002;17:2626–2631.
- Gerris J, De Sutter P, De Neubourg D, Van Royen E, Vander Elst J, Mangelschots K, et al. A real-life prospective health economic study of elective single embryo transfer

- versus two-embryo transfer in first IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod.* 2004;19:917-923.
- Gerris J, Van Royen E. Avoiding multiple pregnancies in ART: a plea for single embryo transfer. *Hum Reprod.* 2000;15:1884-1888.
- Gerris J. Single embryo transfer and IVF/ICSI outcome: a balanced appraisal. *Hum Reprod.* 2005;11:105-121.
- Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod.* 1995;10:2427-2431.
- Gleicher N and Barad DH. Twin pregnancy, contrary to consensus is a desirable outcome in infertility. *Fertil Steril.* 2009;91:2426–2431.
- Gleicher N. Clinician to clinician: for some IVF patients, twins are the best outcome. *Cont Ob/Gyne.* 2013;58:40–46.
- Goldfarb J, Kinzer DJ, Boyle M, Kurit D. Attitudes of in vitro fertilization and intrauterine insemination couples toward multiple gestation pregnancy and multifetal pregnancy reduction. *Fertil Steril.* 1996;65:815–820.
- González F, González AL, Martínez M, Fontes J, Martínez FL, Moliní JL et al. Esterilidad General I. En: Matorras R, Hernandez J. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción. Madrid: Adalia; 2007.pp.3-72.
- González NL. Toxoplasmosis. Documento de Consenso de la SEGO. Madrid: Meditex; 2001.
- Gordts S, Campo R, Puttemans P, Brosens I, Valkenburg M, Norre J, et al. Belgian legislation and the effect of elective single embryo transfer on IVF outcome. *Reprod Biomed Online.* 2005;10:436–441.

Grobman WA, Milad MP, Stout J, Klock SC. Patient perceptions of multiple gestations: an assessment of knowledge and risk aversion. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185:920–924.

Guía de reproducción humana asistida en el Sistema Sanitario Público de Andalucía. Sevilla: Consejería de Igualdad, Salud y Políticas sociales de Andalucía, 2013 [Access December 23. 2013]. Electronic text (pdf), 92 p. Disponible en: www.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud.

Guzick DS. Should Insurance Coverage for in Vitro Fertilization be mandated? *N Eng J Med.* 2002;347:686-688.

Hall JG. Twinning. *Lancet* 2003;362:735–743.

Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, et al. Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects. *Biol Reprod.* 2010;82:679-686.

Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod.* 2001;16:313-318.

Hashimoto S, Kato N, Saeki K, Morimoto Y. Selection of high-potential embryos by culture in poly (dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril.* 2012;97:332-337.

Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, Keirse MJ. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ.* 2004;328:261.

Henman M, Catt JW, Wood T, Bowman MC, de Boer KA, Jansen RP. Elective transfer of single fresh blastocysts and later transfer of cryostored blastocysts reduce the twin pregnancy rate and can improve the in vitro fertilization live birth rate in younger women. *Fertil Steril.* 2005;84:1620–1627.

Henne MB and Bundorf MK. Insurance mandates and trends in infertility treatments. *Fertil Steril.* 2008;9:66-73.

- Herrero J and Meseguer M. Selection of high potential embryos using time lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertil Steril.* 2013;99:1030-1040.
- HFEA (Human Fertilization and Embriology Authority). Code of practice.8th ed. London: Human fertilization and Embriology Authority (HFEA);2009.
- HFEA (Human Fertilization and Embriology Authority). The best posible start to life: a consultation document on multiple births after ART. London: Human Fertility and Embriology Authority of the United Kingdom;2007.
- Higueras T. Incidencia e implicaciones en la salud de la gestación múltiple en España. Complicaciones en gestaciones monocoriales. *Rev Iber Fert.* 2005;22:313-314.
- Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert CM, Osteen KG, et al. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 1989;52:801-806.
- Hlinka D, Kalatova B, Uhrinova I, Dolinksa S, Rutarova J, Rezacova J, et al. Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. *Physiol Res.* 2012;61:513 –525.
- Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod.* 2004;19:288-293.
- Højgaard A, Ottosen LDM, Kesmodel U, Ingerslev HJ. Patient attitudes towards twin pregnancies and single embryo transfer – a questionnaire study. *Hum Reprod.* 2007;22:2673-2678.
- Holte J, Berglund L, Milton K, Garelo C, Gennarelli G, Revelli A, et al. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Hum Reprod.* 2007;22:548-557.
- Honig SC, Lipshultz LI, Jarow J. Significant medical pathology uncovered by a comprehensive male infertility evaluation. *Fertil Steril.* 1994;62:1028-1034.

- Hope N, Rombauts L. Can an educational DVD improve the acceptability of elective single embryo transfer? A randomized controlled study. *Fertil Steril*. 2010;94:489–495.
- Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S, et al. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod*. 2005;11:195-205.
- Hyden-Granskog C, Unkila-Callio L, Haltunnen M, Tiitinen A. Single embryo transfer is an option in frozen embryo transfer. *Hum Reprod*. 2005;20:2935-2938.
- INE. Instituto Nacional de Estadística. ¿Cuántos somos en casa? Boletín informativo del Instituto Nacional de Estadística [en línea] 2004 [acceso 16 Agosto 2014] Disponible en: http://www.ine.es/ss/Satellite?L=0&c=INECifrasINE_C&cid=1259925137801&p=1254735116567&pagename=ProductosYServicios%2FPYSLayout
- Ishihara O, Araki R, Kuwahara A, Itakura A, Saito H, Adamson D. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: an analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan. *Fertil Steril*. 2014;101:128-133.
- Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 1998;70:60-66.
- Jacobson TZ, Barlow DH, Koninckx PR, Olive D, Farquhar C. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;4:CD001398.
- Jain T, Harlow BL, Hornstein MD. Insurance coverage and outcomes of in vitro fertilization. *N Eng J Med*. 2002;347:661-666.
- James AN, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod*. 2006;21:1599-1604.

- Jarrow J and Sigman M. Office evaluation of the subfertile male. *J Uro.* 1999;152:2017-2019.
- Johansson M, Hardarson T, Lundin K. There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *J Assist Reprod Genet.* 2003;20:309-313.
- Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000;15:2390-2393.
- Kaser D and Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2014;20:617-623.
- Katz-Jaffe M, McReynolds S, Gardner K, Schoolcraft W. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol Hum Reprod.* 2009;15:271–277.
- Kawachiya S, Bodri D, Shimada N, Kato K, Takehara Y, Kato O. Blastocyst culture is associated with an elevated incidence of monozygotic twinning after single embryo transfer. *Fertil Steril.* 2011;95:2140–2142.
- Khalaf Y, El-Toukhy T, Coomarasamy A, Kamal A, Bolton V, Braude P. Selective single blastocyst transfer reduces the multiple pregnancy rate and increases pregnancy rates: a pre- and postintervention study. *BJOG.* 2008;115:385–390.
- Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2013;28:2643-2651.
- Kjellberg AT, Carlsson P, Bergh C. Randomized single versus double embryo transfer: obstetric and paediatric outcome and a cost-effectiveness analysis. *Hum Reprod.* 2006;21:210-216.

- Klemetti R, Gissler M, Sevón T, Hemminki E. Resource allocation of in-vitro fertilization: a nationwide register-based cohort study. *BMC Health Services Research*. 2007;7:210-216.
- Knopman J, Krey L, Cheongeun O, Lee J, McCaffrey C, Noyes N. What makes them split? Identifying risk factors that lead to monozygotic twins after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2014;1:82-89.
- Knopman JM, Krey LC, Lee J, Fino ME, Novetsky AP, Noyes N. Monozygotic twinning: an eight-year experience at a large IVF center. *Fertil Steril*. 2010;94: 502–510.
- Koch J, Costello M, Chapman M, Kilani S. Twice-frozen embryos are no detriment to pregnancy success: a retrospective comparative study. *Fertil Steril*. 2011;96:58-62.
- Kreuwel IA, van Peperstraten AM, Hulscher ME, Kremer JA, Grol RP, Nelen WL, et al. Evaluation of an effective multifaceted implementation strategy for elective single-embryo transfer after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2013;28:336-342.
- Kumasako Y, Otsu E, Utsunomiya T, Araki Y. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertil Steril*. 2009;91:383-386.
- Kupka MS, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, D'Hooghe T, Castilla JA, et al. The European IVF-monitoring (EIM); Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2014;29:2099-2113.
- Kutlu P, Atvar O, Vanlioglu OF, Kutlu U, Arici A, Yilmaz S, et al. Effect of the new legislation and single-embryo transfer policy in Turkey on assisted reproduction outcomes: preliminary results. *Reprod Biomed Online*. 2011;22:208–214.
- Kvist U and Björndahl L. *ESHRE Monographs: Manual on Basic Semen Analysis*. Oxford Oxford University Press; 2002.

- Lambalk CB and van Hooff M. Natural versus induced twinning and pregnancy outcome: a Dutch nationwide survey of primiparous dizygotic twin deliveries. *Fertil Steril.* 2001;75:731–736.
- Land JA, Gijsen AP, Evers JL, Bruggeman CA. Chlamydia tracomatis in subfertile women undergoing uterine instrumentation. Screen or treat? *Hum Reprod.* 2002;17:525-527.
- Larman MG, Minasi MG, Rienzi L, Gardner DK. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2007;15:692-700.
- le Lannou D, Griveau JF, Laurent MC, Gueho A, Veron E, Morcel K. Contribution of embryo cryopreservation to elective single embryo transfer in IVF-ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006;13:368–375.
- Lédée N, Gridelet V, Ravet S, Jouan C, Gaspard O, Wenders F, et al. Impact of follicular GCSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study. *Human Reproduction.* 2013;28:406–413.
- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI fertilized oocytes. *Repro Biomed Online* 2008;17:385-391.
- Ley Orgánica 14/2006, de 26 de Mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. Boletín oficial del Estado, 27 de Mayo de 2007, núm 180. pp. 19947-19956.
- Ley Orgánica 45/2003, de 21 de Noviembre, sobre técnicas de reproducción humana asistida. Boletín oficial del Estado, 22 de Noviembre de 2003, núm 280. pp. 41458-41463.
- Li Y, Chen ZJ, Yang HJ, Zhong WX, Ma SY, Li M. Comparison of vitrification and slow-freezing of human day 3 cleavage stage embryos: post-vitrification development and pregnancy outcomes. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2007;42:753-755.
- Liu SY, Teng B, Fu J, Li X, Zheng Y, Sun XX. Obstetric and neonatal outcomes after transfer of vitrified early cleavage embryos. *Hum Reprod.* 2013; PMID:23569081.

- Liu SY, Teng B, Fu J, Li X, Zheng Y, Sun XX. Obstetric and neonatal outcomes after transfer of vitrified early cleavage embryos. *Hum Reprod.* 2013;28:2093-2100.
- Loutradi K, Kolobianakis E, Venetis C, Papanikolaou E, Pados G, Bontis I et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2008;90:186-193.
- Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinou S, Michalas S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1999;72:240-244.
- Ludwig M, Schöpfer B, Al-Hasani S, Diedrich K. Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod.* 2000;15:325-329.
- Lukassen H, Braat D, Wetzels A, Zielhuis G, Adang E, Scheenjes E, Kremer J. Two cycles with single embryo transfer versus one cycle with double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005;20:702-708.
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod.* 2001;16:2652-2657.
- Macaldowie A, Wang YA, Chambers GM, Sullivan EA 2013. Assisted reproductive technology in Australia and New Zealand 2011. Sydney: National Perinatal Epidemiology and Statistics Unit, the University of New South Wales. Disponible en: <http://npesu.unsw.edu.au/>
- Mackenna A, Crosby J, Zegers-Hochschild F. Sibling embryo blastocyst development as a prognostic factor for the outcome of day-3 embryo transfer. *Reprod Biomed Online.* 2013;26:486-490.
- Magyar D, Boyers S, Marshall J, Abraham G. Regular menstrual cycles and premenstrual molimina as indicators of ovulation. *Obstet Gynecol.* 1979;53:411-414.
- Maheshwari A and Bhattacharya S. Elective frozen replacement cycles for all: ready for prime time?. *Hum Reprod.* 2013;28:6-9.

- Maheshwari A, Griffiths S, Bhattacharya S. Global variations in the uptake of single embryo transfer. *Hum Reprod.* 2011;17:107-120.
- Martikainen H, Orava M, Lakkakorpi J, Tuomivaara L. Day 2 elective single embryo transfer in clinical practice: better outcome in ICSI cycles. *Hum Reprod.* 2004;6:1364-1366.
- Martikainen H, Tiitinen A, Tomás C, Tapanainen J, Orava M, Tuomivaara L, et al. One versus two embryo transfer after IVF and ICSI: a randomized study. *Hum Reprod.* 2001;16:1900-1903.
- Martínez-Burgos M, Herrero L, Megías D, Salvanes R, Montoya MC, Cobo AC, et al. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on orphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil Steril.* 2011;95:374-377.
- Matorras R and Hernández J. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción. Madrid: Adalia; 2007.
- McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neubourg D, Dumoulin JC, et al. Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *BMJ.* 2010;341:c6945.
- McReynolds S, Vanderlinden L, Stevens J, Hansen K, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Lipocalin-1: a potential marker for noninvasive aneuploidy screening. *Fertil Steril.* 2011;95:2631-2633.
- Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online.* 2004;9:511-520.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing N, Remohí J. The use of morfokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011; 26:2658-2671.

- Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012; 98:1481-1489.
- Mio Y and Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199:660.e1-5.
- Mosher W and Pratt W. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril*. 1991;56:192-193.
- Moustafa M, Sheded S, El Aziz Moustafa M. Elective single embryo transfer versus double embryo transfer in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:82-87.
- Muñoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Pérez Cano I, Meseguer M. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol*. 2013; 168:167-172.
- Murakami M, Egashira A, Murakami K, Araki Y, Kuramoto T. Perinatal outcome of twice-frozen-thawed embryo transfers: a clinical follow-up study. *Fertil Steril*. 2011;95, 2648-2650.
- Nagy Z, Sakkas D, Behr B. Noninvasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ("metabolomics"). *Reprod Biomed Online*. 2008;17:502–507.
- Nakagawa K, Nishi Y, Sugiyama R, Kuribayashi Y, Sugiyama R, Inoue M. Elective single cleavage-stage embryo transfer need not result in lower pregnancy rates compared to double cleavage-stage embryo transfer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2010;36:777-782.
- Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M, et al. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2010; 27:93-96.

- Navarro JL, Castilla JA, Martínez L, Hernández E, Fontes J. Coverage and current practice patterns regarding assisted reproduction techniques. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;138:3-9.
- Navarro JL, Martínez L, Castilla JA, Hernández E. Costes de las técnicas de reproducción asistida en un hospital público. *Gac Sanit.* 2006;20:382-390.
- Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod.* 2003;18:1307-1312.
- Newton C, Feyles V, Asgary-Eden V. Effect of mood states and infertility stress on patients' attitudes toward embryo transfer and multiple pregnancy. *Fertil Steril.* 2013;100:530-537.
- Newton CR, McBride J, Feyles V, Tekpetey F, Power S. Factors affecting patients' attitudes toward single- and multiple-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2007;87:269-278.
- Nicolás M, Ballesteros A, Landeras J, Fernández L, Villaquirán AM, Mollá M, et al. *Inseminación Artificial. Manual práctico de reproducción humana. 2ª ed.* Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España, 2004.pp.142-156.
- Nieschlag E and Behre HM. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction.* Heidelberg: Springer; 1997.
- Niinimäki M, Suikkari M, Mäkinen S, Söderström-Anttila V, Martikainen H. Elective single-embryo transfer in women aged 40-44 years. *Hum Reprod.* 2013;28:331-335.
- Nyboe Andersen A, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal-loss: population based register linkage study. *BMJ.* 2000;320:1708-1712.
- Ombelet W, Martens G, De Sutter P, Gerris J, Bosmans E, Ruysinck G, Defoort P, Molenberghs G, Gyselaers W. Perinatal outcome of 12 021 singleton and 3108 twin births after non-IVF-assisted reproduction: a cohort study. *Hum Reprod.* 2006;4:1025-1032.

- Opsahl MS, Miller B, Klein TA. The predictive value of hysterosalpingography for tubal and peritoneal infertility factors. *Fertil Steril*. 1993;60:444-448.
- Ory SJ, Devroey P, Banker M, Brinsden P, Buster J, Fiadjoe M. International Federation of Fertility Societies Surveillance 2013: preface and conclusions. *Fertil Steril*. 2014;101:1582-1583.
- Pandian Z, Bhattacharya S, Ozturk O, Serour G, Templeton A. Number of embryos for transfer following in-vitro fertilization or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;15:CD003416.
- Pandian Z, Bhattacharya S, Ozturk O, Serour G, Templeton A. Number of embryos for transfer following in-vitro fertilization or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;7:CD003416.
- Papanikolaou EG, Bourgain C, Kolibianikis E, Tournaye H, Devroey P. Steroid receptor expression in late follicular phase endometrium in GnRH antagonist IVF cycles is already altered, indicating initiation of early luteal phase transformation in the absence of secretory changes. *Hum Reprod*. 2005;20:1541-1547.
- Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, van Steirteghem A, Devroey P. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N Engl J Med*. 2006;354:1139-1146.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*. 1997;12:532-541.
- Peeraer K, Debrock S, Laenen A, De Loecker P, Spiessens C, De Neubourg D, et al. The impact of legally restricted embryo transfer and reimbursement policy on cumulative delivery rate after treatment with assisted reproduction technology. *Hum Reprod*. 2014;29:267-275.
- Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998;13:960-963.

- Per Sundstrom and Pia Saldeen. Cumulative delivery rate in an in vitro fertilization program with a single embryo transfer policy. *Acta Obst et Gyne*. 2009;88:700-706.
- Perales-Marín A, Perales-Puchalt A, Hidalgo-Mora J, Zamora-Pardo J, Diango-Almela V. Los beneficios obstétricos de evitar embarazos múltiples. En: García- Velasco J, Barri P, editors. *Cuadernos de Medicina Reproductiva*. Vol 18. Madrid:ANARR;2012. p. 75-88.
- Piaggio G, Elbourne DR, Altman DG, Pocock SJ, Evans SJ. CONSORT Group. Reporting of noninferiority and equivalence randomized trials: An extension of the CONSORT statement. *JAMA*. 2006;295:1152-1160.
- Pinborg A, Loft A, Schmidt L, Andersen AN. Attitudes of IVF/ICSI-twin mothers toward twins and single embryo transfer. *Hum Reprod*. 2003;18:621–677.
- Polinder S, Heijnen EM, Macklon NS, Habbema JD, Fauser BJ, Eijkemans MJ. Cost-effectiveness of a mild compared with a standard strategy for IVF: a randomized comparison using cumulative term live birth as the primary endpoint. *Hum Reprod*. 2008;23:316-323.
- Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology (SART) and Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Elective single embryo transfer. *Fertil Steril* 2012;97:835-842.
- Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology (SART) and Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Criteria for number of embryos to transfer: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;1;44-46.
- Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology (SART) and Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Guidelines on number of embryos transferred. *Fertil Steril*. 2009;92:1518–1519.
- Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology (SART) and Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Guidelines on number of embryos transferred. *Fertil Steril*. 2006;86:51–52.

- Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology (SART) and Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Guidelines on the number of embryos transferred. *Fertil Steril*. 2004;82:773–774.
- Prados N, Quiroga R, Caligara C, Ruiz M, Blasco V, Pellicer A, Fernández-Sánchez M. Elective single versus double embryo transfer: live birth outcome and patient acceptance in a prospective randomised trial. *Reprod Fertil Dev*. 2014b; doi: 10.1071/RD13412. [Epub ahead of print]
- Prados F, De los Santos MJ, Cabello Y, Buxaderas R, Segura A, Hernández J, 2012. [Online] Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI). Available at: https://www.registrosef.com/public/Docs/sef2014_IAFIV.pdf
- Prieto B. Implicaciones económicas del parto múltiple. *Rev Iber Fertil*. 2005; 22:331-338.
- Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, et al. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online*. 2003;6:323-331.
- Ragni G, Levi-Setti PE, Fadini R, Brigante C, Scarduelli C, Alagna F, et al. Clomiphene citrate versus high doses of gonadotropinas for in vitro fertilisation in women with compromised ovarian reserve: randomised controlled non-inferiority trial. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;10:114-118.
- Rama GA, Haranath GB, Krishna KM, Prakash GJ, Madan K. Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod BioMed Online*. 2005;11:434-437.
- Rantala ML. Causes and outcome of infertility in previously unexamined couples. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1988;67:429-432.
- Remohi J, Romero JL, Pellicer A, Simón C y Navarro J. Manual práctico de reproducción humana. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España, 2004.

- Ricciarelli E. Embarazo múltiple. Estudio y tratamiento de la pareja esteril. Recomendaciones de la sociedad española de fertilidad. Madrid: Adalia;2007b:395-400.
- Ricciarelli E. Marco de actitud ante las gestaciones múltiples: Legislaciones y recomendaciones. Rev Iber Fertil. 2007a;24:405-410.
- Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. Fertil Steril. 2001;76:1157-1167.
- Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, et al. Significance of morphological attributes of the early embryo. Reprod Biomed Online. 2005;10:669-681.
- Rijnders PM and Jansen CA. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1998;13:2869-2873.
- Roberts SA, McGowan L, Mark Hirst W, Vail A, Rutherford A, Lieberman BA, et al. Reducing the incidence of twins from IVF treatments: predictive modelling from a retrospective cohort. Hum Reprod. 2011;26:569-575.
- Roberts, SA., Fitzgerald, CT., Brison, D. Modelling the impact of single embryo transfer in a national health service IVF programme. Hum Reprod. 2009; 24:122-131.
- Rodríguez DB, Tur R, Mancini F, Parriego M, Rodríguez I, Coroleu B, et al. Elective single embryo transfer and cumulative pregnancy rate: five-year experience in a Southern European Country. Gynecol Endocrinol. 2012 28: 425-428.
- Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. Fertil Steril. 2013;99:156–162.
- Rosenthal M. Aetna follows best practices for IVF procedures. Managed Healthcare Executive .First published 1 April 2013. <http://>

managedhealthcareexecutive.modernmedicine.com/managedhealthcareexecutive/news/managed-healthcare-executive/news-analysis/aetnafollows- best-prac

Roux C, Borodkine R, Joanne C, Bresson JL, Agnani G. Morphological classification of human in-vitro fertilization embryos based on the regularity of the asynchronous division process. *Hum Reprod Update*. 1995;1:488-496.

Roy T, Bradley C, Bowman M, McArthur S. Single-embryo transfer of vitrified-warmed blastocysts yields equivalent live-birth rates and improved neonatal outcomes compared with fresh transfers. *Fertil Steril*. 2014;101:1294-1301.

Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá MJ, et al. Limited implantation success of direct- cleaved human zygotes: a time lapse study. *Fertil Steril*. 2012;98:1458-1463.

Ruiz de Assin R, Clavero A, Gonzalvo MC, Ramirez JA, Zamora S, Fernández A, Martínez L. Comparison of methods to determine the assigned value in an external quality control programme for embryo evaluation. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:824-829.

Ryan GL, Sparks AE, Sipe CS, Syrop CH, Dokras A, Van Voorhis BJ. A mandatory single blastocyst transfer policy with educational campaign in a United States IVF program reduces multiple gestation rates without sacrificing pregnancy rates. *Fertil Steril*. 2007;88:354-360.

Ryan GL, Zhang SH, Dokras A, Syrop CH, van Voorhis BJ. The desire of infertile patients for multiple births. *Fertil Steril*. 2004;81:500-504.

Sadowy S, Tomkin G, Munné S, Ferrara-Congedo T, Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote*. 1998;6:137-141.

Saftlas AF, Olson DR, Franks AL, Atrash HK, Pokras R. Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;163:460-465.

Salumets A, Hydén-Granskog C, Mäkinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod*. 2003;18:821-825.

- Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod.* 2001;16:2177-2181.
- Schoolcraft WB and Katz-Jaffe MG. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advancedmaternal age. *Fertil Steril.* 2013;100:615-619.
- Scotland GS, McLernon D, Kurinczuk JJ, McNamee P, Harrild K, Lyall H, et al. Minimising twins in vitro fertilisation: a modelling study assessing the costs, consequences and cost utility of elective single versus double embryo transfer over a 20-year time horizon. *BJOG.* 2011;118:1073-1083.
- Scott L. Predicting Embryo Development. En: Rabe T, Dietrich K, Strowitzki T. *Manual on Assisted Reproduction.* Springer; 2000.p.321-338.
- Scott LA and Simth S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod.* 1998;13:1003-1013.
- Sebire NJ, Snijders RJ, Hughes K, Sepulveda W and Nicolaidis KH (1997) The hidden mortality of monochorionic twin pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 104,1203–1207.
- SEF (Sociedad Española de Fertilidad) [en línea]. 2011 [acceso 9 May 2011]. Disponible en: <http://nuevo.sefertilidad.com/index.php>
- Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, et al. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril.* 2010;2:535-542.
- Sellés E, Mollá M, Nicolás M, Santa A, Gómez E, Garda AL et al. Capacitación Espermática. En: José Remohí. *Manual práctico de reproducción humana.* 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España, 2004.p.283-287.

- Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Kadhum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1997;12:1267-1270.
- Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction.* 2003;126:12-25.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. *Fertil Steril.* 2014;102:3-9.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril.* 2011;96:344-348.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Restrepo H, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Matched-cohort comparison of single-embryo transfers in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles. *Fertil Steril.* 2013;99:389-392.
- Shaw PW, Bernard AG, Fuller BJ, Hunter JH, Shaw RW. Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure times on survival. *Mol Reprod Dev.* 1992;33:210-214.
- Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod.* 1997;12:1531-1536.
- Sifer C, Herbemont C, Adda-Herzog E, Sermondade N, Dupont C, Cedrin-Durnerin I. Clinical predictive criteria associated with live birth following elective single embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;181:229-223.
- Simon C and Pellicer A. Encuentro de expertos sobre gestaciones múltiples. *Rev Iber Fert.* 2005;22:309-310.

- Skiadas C, Missmer SA, Benson CB, Gee RE, Racowsky C. Risk factors associated with pregnancies containing a monochorionic pair following assisted reproductive technologies. *Hum Reprod.* 2008;23:1366-1371.
- Staessen C, Camus M, Bollen N, Devroey P, Van Steirteghem AC. The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril.* 1992;57:626-630.
- Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod.* 1992;7:117-119.
- Stillman RJ, Richter KS, Banks NK, Graham JR. Elective single embryo transfer: a 6-year progressive implementation of 784 single blastocyst transfers and the influence of payment method on patient choice. *Fertil Steril.* 2009;92:1895-1906.
- Stillman RJ, Richter KS, Jones HW Jr. Refuting a misguided campaign against the goal of single-embryo transfer and singleton birth in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2013;28:2599-2607.
- Straughen JK, Salihu HM, Keith L, Petrozzino J, Jones C. Obligatory versus elective single embryo transfer in in vitro fertilization. A population-based analysis of data from the U.K. Human Fertilisation and Embryology Authority. *J Reprod Med.* 2013;58:95-100.
- Stromberg B, Dalhquist G, Ericsson A, Finnstrom O, Koster M, Stjernqvist K. Neurological sequelae in children born after in vitro fertilization: a population-based study. *Lancet.* 2009;359:461-465.
- Sturmey RG, Brison DR, Leese HJ. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Assessing embryo viability by measurement of amino acid turnover. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:486-496.
- Subcomité de Prestaciones del Consejo Interterritorial de la Salud. La reproducción humana asistida en España. Criterios para su priorización. Madrid: Consejo Interterritorial de la Salud. Ministerio de Sanidad y Consumo; 2002.

- Sullivan A, Wang A, Hayward I, Chambers M, Illingworth P, McBain J, et al. Single embryo transfer reduces the risk of perinatal mortality, a population study. *Hum Reprod.* 2012;27:3609-3615.
- Sunkara SK, Khalaf Y, Maheshwari A, Seed P, Coomarasamy A. Association between response to ovarian stimulation and miscarriage following IVF: an analysis of 124 351 IVF pregnancies. *Hum Reprod.* 2014;29:1218-1224.
- te Velde ER, Nieboer D, Lintsen AM, Braat DD, Eijkemans MJ, Habbema JD, et al. Comparison of two models predicting IVF success; the effect of time trends on model performance. *Hum Reprod.* 2014;29:57-64.
- Templeton A and Morris JK. Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. *N Eng J Med.* 1998; 339:573-577.
- Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet.* 1996;348:1402-1406.
- Tesarik J and Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.* 1999;14:1318-1323.
- Thurin A, Hausken J, Hillensjö T, Jablanoswka B, Pinborg A, Strandell A, Bergh C. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in-vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2004;351:2392-2402.
- Tiitinen A, Halttunen M, Härkki P, Vuoristo P, Hyden-Granskog C. Elective single embryo transfer: the value of cryopreservation. *Hum Reprod.* 2001;16:1140-1144.
- Tiitinen A, Unkila-Kallio L, Halttunen M, Hyden-Granskog C. Impact of elective single embryo transfer on the twin pregnancy rate. *Hum Reprod.* 2003;18:1449-1453.
- Tur R, Coroleu B, Torelló MJ, Boada M, Veiga A, Barri PN. Prevención del embarazo múltiple en fecundación in vitro en España. *Rev Iber Fertil.* 2005;22:315-322.
- Tur R, Coroleu B, Torelló MJ, Boada M, Veiga A, Barri PN. Prevention of multiple pregnancy following IVF in Spain. *Reprod Biomed Online.* 2006;13:856-863.

- Urman B, Yakin K. New Turkish legislation on assisted reproductive techniques and centres: a step in the right direction? *Reprod Biomed Online*. 2010;21:729-31.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 1998;51:53-58.
- Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod*. 2000;15:2621-2633.
- Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech*. 1990;16:324-346.
- van Dongen AJ, Verhagen TE, Dumoulin JC, Land JA, Evers JL. Reasons for dropping out from a waiting list for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010;94:1713-1716.
- Van Jaarsveld CHM, Llewellyn CH, Fildes A, Fisher A, Wardle J. Are my twins identical: parents may be misinformed by prenatal scan observations? *BJOG*. 2012;119:517-518.
- van Landuyt L, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Devroey P, van Steirteghem A. New Belgian embryo transfer policy leads to sharp decrease in multiple pregnancy rate. *Reprod Biomed Online*. 2006;13:765-771.
- van Loendersloot LL, van Wely M, Repping S, Bossuyt PM, van der Veen F. Individualized decision-making in IVF: calculating the chances of pregnancy. *Hum Reprod*. 2013;28:2972-2980.
- van Montfoort AP, Fiddelers AA, Janssen JM, Derhaag JG, Dirksen CD, Dunselman GA, et al. In unselected patients, elective single embryo transfer prevents all multiples, but results in significantly lower pregnancy rates compared with double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2006;21:338-343.

- van Peperstraten AM, Hermens RP, Nelen WL, Stalmeier PF, Scheffer GJ, Grol RP, et al. Perceived barriers to elective single embryo transfer among IVF professionals: a national survey. *Hum Reprod.* 2008a;23:2718–2723.
- van Peperstraten AM, Nelen WL, Hermens RP, Jansen L, Scheenjes E, Braat DD, Grol RP, Kremer JA. Why don't we perform elective single embryo transfer? A qualitative study among IVF patients and professionals. *Hum Reprod.* 2008b;23:2036-2042.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod.* 1999;14:2345-2349.
- van Royen E, Mangelschots K, de Neubourg D, Valkenburg M, van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step toward single-embryo transfer. *Hum Reprod.* 1999;14:2345-2349.
- Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, et al. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod.* 2003;18:1062-1069.
- Vanrell J, Balasch J, Cívico S. Esterilidad de origen desconocido: incidencia y resultados de la fecundación in vitro. *Prog Obst Gin.* 1993;36:128-132.
- Veeck L. An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group; 1999.
- Veleva Z, Karien P, Tomás C, Tapanainen JS, Martikainen H. Elective single embryo transfer with cryopreservation improves the outcome and diminishes the costs of IVF/ICSI. *Hum Reprod.* 2009;24:1632-1639.
- Veleva Z, Vilksa S, Hyden-Granskog C, Tiitinen A, Tapanainen JS, Martikainen H. Elective single embryo transfer in women aged 36–39 years. *Hum Reprod.* 2006;21:2098-2102.

- Vélez MP, Connolly MP, Kadoch IJ, Phillips S, Bissonnette F. Universal coverage of IVF pays off. *Hum Reprod.* 2014;29:1313-1319.
- Vélez MP, Kadoch IJ, Phillips SJ, Bissonnette F. Rapid policy change to single-embryo transfer while maintaining pregnancy rates per initiated cycle. *Reprod Biomed Online.* 2013;26:506-511.
- Vergouw CG, Kieslinger DC, Kosteljik EH, Bros LL, Schats R, Hompes PG, et al. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with nearinfrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2012;27:2304-2311.
- Vilks S, Tiitinen A, Hydén-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;14:2392-2395.
- Voelker R. Researches in Canada call for policy to mandate single-Embryo Transfer in IVF. *JAMA.* 2011;305:1848.
- Walker MC, Murphy KE, Pan S, Yang Q, Wen SW. Adverse maternal outcomes in multifetal pregnancies. *BJOG.* 2004;111:1294-1296.
- Wang XL, Zhang X, Qin YQ, Hao DY, Shi HR. Outcomes of day 3 embryo transfer with vitrification using Cryoleaf: a 3-year follow-up study. *J Assit Reprod Genet.* 2012;29:883-889.
- Warner CM, Lampton PW, Newmark JA, Cohen J. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Soluble human leukocyte antigen-G and pregnancy success. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:470-485.
- Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Van Landuyt L, Coucke W, et al. Pregnancy prediction in single embryo transfer cycles after ICSI using QPCR: validation in oocytes from the same cohort. *PLoS ONE.* 2013;8:e54226.
- Weghofer A, Klein K, Stammeler-Safar M, Barad DH, Worda C, Husslein P, et al. Severity of prematurity risk in spontaneous and in vitro fertilization twins: does conception mode serve as a risk factor?. *Fertil Steril.* 2009;92:2116-2118.

- Weidner W, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Pomerol JM and Ghosh C. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol.* 2002;42:313-322.
- WHO, World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction.* 5th Ed. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 2010.
- Wimalasundera RC, Trew G, Fisk NM. Reducing the incidence of twins and triplets. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003;17:309-329.
- Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod.* 2000;15:2591-2597.
- Wølner-Hanssen P, Rydhstroem H. Cost-effectiveness analysis of in-vitro fertilization: estimated costs per successful pregnancy after transfer of one or two embryos. *Hum Reprod.* 1998;13:88-94.
- Wong C, Loewke K, Bossert N, Behr B, De Jonge C, Baer T, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol.* 2010;28:1115-1121.
- Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M. Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2005. *MMWR Surveill Summ.* 2008;57:1-23.
- Wright VC, Schieve LA, Reynolds MA, Jeng G. Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2002. *MMWR Surveill Summ.* 2005;54:1-24.
- Wu MY, Chao KH, Chen CD, Chang LJ, Chen SU, Yang YS. Current status of comprehensive chromosome screening for elective single-embryo transfer. *Obstet Gynecol Int.* 2014:ID581783.
- Xiong X, Saunders LD, Wang FL, Demianczuk NN. Gestational diabetes mellitus: prevalence, risk factors, maternal and infant outcomes. *Int J Gynecol Obstet.* 2001;75:221-228.

- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, et al. Selection of single blastocyst for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results form a randomized pilot study. *Mol Cytogenet.* 2012;5:24-29.
- Zaib-un-Nisa S, Ghazal-Aswad S, Badrinath P. Outcome of twin pregnancies after assisted reproductive techniques: a comparative study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;109:51-54.
- Zamora S, Clavero A, Gonzalvo MC, Luna del Castillo JD, Roldan-Nofuentes JA, Álvarez C, et al. PGS-FISH in reproductive medicine and perspective directions for improvement. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio.* 2011;28:747-757.
- Zech NH, Lejeune B, Puissant F, Vanderzwalmen S, Zech H, Vanderzwalmen P. Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5. *Fertil Steril.* 2007;88:244-246.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology. World Health Organization. The International Committee for Monitoring Assited Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod.* 2009;24:2683-2687.
- Zhang XJ, Yang YZ, Lv Q, Wang Y, Cao XH, Guo C, et al. The impact of two different thaw protocols on outcomes of vitrified cleavage-stage embryos transfer. *Cryo Letters.* 2012;33:411-417.
- Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997;12:1545-1549.
- Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod.* 2002;17:1327-1333.

ANEXOS

ANEXO 1: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE DEL ESTUDIO

“Transferencia de embrión único con criopreservación de embrión único versus transferencia de dos embriones en un programa de FIV/ICSI”

Objetivos:

El objetivo del estudio consiste en la disminución de la probabilidad de obtener un embarazo múltiple sin disminuir la posibilidad de la pareja de conseguir un niño sano en casa.

Metodología empleada:

Las parejas participantes en el estudio serán divididas aleatoriamente en dos grupos. A cada pareja se le realizará el Estudio Básico de Esterilidad de rutina en nuestro centro, con las pruebas que sean necesarias en cada caso (seminograma, ecografías, analítica, histerosalpingografía en caso de ser necesaria...). La mujer será sometida a un tratamiento estimulador de la ovulación, el cual será el mismo independientemente del grupo al que sea asignada la pareja. La técnica de la punción ovárica, así como la de la transferencia de embriones serán las mismas en los dos grupos. En todos los casos se seguirán las pautas habituales de la Unidad de reproducción del H.U. Virgen de las Nieves. La diferencia se basa en el número de embriones que se transferirán en cada grupo:

- Grupo 1: transferencia electiva de un único embrión seguida, en caso de no quedar gestante, de un ciclo de criotransferencia con un embrión previamente criopreservado.
- Grupo 2: transferencia de dos embriones.

El estudio se ha diseñado como un estudio prospectivo aleatorizado. Los datos serán recogidos mediante la base de datos habitual de la Unidad de Reproducción.

Beneficios esperados y riesgos potenciales:

Disminución de la probabilidad de embarazo múltiple, con la consiguiente disminución de los riesgos para la madre e hijos que el embarazo múltiple conlleva.

Por participar en el estudio no existe ningún riesgo adicional a los existentes al someterse a un ciclo de Fecundación in Vitro.

Uso de las muestras biológicas

No existe ningún uso de las muestras biológicas fuera del habitual en los protocolos de Fecundación in Vitro.

Participación en el estudio y protección de datos:

La participación en el estudio es voluntaria, teniendo la pareja la posibilidad de revocar su consentimiento en cualquier momento.

De acuerdo a la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se le requieren son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerán los nombres de la pareja, y sus identidades no serán reveladas a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada por medios informáticos en condiciones de seguridad. El acceso a dicha información quedará restringido al personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad. La pareja tiene derecho al acceso de sus datos personales, y si está justificado tiene derecho a su rectificación y cancelación.

ANEXO 2: CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

“Transferencia de embrion unico con criopreservacion de embrión único versus transferencia de dos embriones en un programa de FIV/ICSI”

Yo, (nombre y apellidos)

.....(Cónyuge A)

Yo, (nombre y apellidos)

.....(Cónyuge B)

Hemos leído la hoja de información que se nos ha entregado.

Hemos podido hacer preguntas sobre el estudio.

Hemos recibido suficiente información sobre el estudio.

Hemos hablado con el

Dr.....

Comprendo que nuestra participación es voluntaria.

Comprendo que podemos retirarnos del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Prestamos libremente nuestra conformidad para participar en el estudio

Fecha

Firma de los pacientes

Fecha

Firma del Investigador