



**TRANSFERENCIA DE BLASTOCISTOS EN UN PROGRAMA DE
DONACIÓN DE OVOCITOS:
CÓMO REDUCIR EL EMBARAZO MÚLTIPLE DE ALTO ORDEN
BLASTOCYST TRANSFER IN AN OOCYTE DONATION PROGRAM:
HOW TO REDUCE THE MULTIPLE PREGNANCY OF HIGH ORDER**

Jimmy Portella Ruiz
jimmy.portella@pranor.com

Licenciado en Biología por la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú. Jefe del Laboratorio de Reproducción Asistida del Grupo Pranor, sede San Isidro, Lima. Perú.

Recibido: 29 de agosto de 2014

Aceptado: 26 de setiembre de 2014

SUMARIO

Introducción
Conceptos básicos
Materiales y métodos
Resultados
Discusión
Conclusión

RESUMEN

En las técnicas de reproducción asistida, la transferencia embrionaria se ha llevado a cabo en estadio de clivaje al segundo o tercer día después de la aspiración de ovocitos. Sin embargo, en los últimos años se ha introducido la transferencia embrionaria en estadio de blastocisto. El objetivo del presente estudio fue evaluar las tasas de embarazo e implantación cuando se transfieren embriones en el día 3 en estadio de clivaje y en el día 5 en estadio de blastocisto, dentro de un programa de reproducción asistida con donación de ovocitos. Se estudiaron de manera retrospectiva un total de 1667 ciclos; de los cuales 594 ciclos fueron con transferencia embrionaria en día 3, y 1073 ciclos, en día 5. Las tasas de implantación (29,09% vs 44,85%), embarazo (51,01% vs 61,7%) y parto (44,28% vs 52,19%) fueron significativamente mayores con la transferencia de embriones en estadio de blastocisto comparada a embriones en estadio de clivaje. Por el contrario, las tasas de embarazo múltiple de alto orden fueron reducidas con la transferencia en día 5. En conclusión, los resultados de este estudio apoyan la transferencia de blastocistos en favor de un mayor potencial de implantación y menor riesgo de embarazo múltiple de alto orden, reduciendo el número de embriones transferidos.

PALABRAS CLAVE

Embrión, blastocisto, transferencia día 3, transferencia día 5, fecundación *in vitro*, donación de ovocitos.

ABSTRACT

Commonly the assisted reproduction technology was based on the transfer of cleavage-stage embryos in day 2 or 3 after oocyte retrieval. However, in the last years is common the embryo transfer in the blastocyst-stage. The aim of the present study was to evaluate the pregnancy and implantation rates when embryo transfer was carried out in cleavage-stage embryos in day 3 or in blastocyst-stage embryos in day 5 in an assisted reproduction program with oocyte donation. 1667 cycles of assisted reproduction were studied retrospectively, 594 cycles with embryo transfer of day 3 and 1073 cycles of day 5. Implantation (29,09 % vs 44,85 %), pregnancy (51,01 % vs 61,7%) and delivery (44,28 % vs 52,19 %) rates were significantly higher with the blastocyst group transfer compared to cleavage-stage embryos group. Instead, the higher-order multiple pregnancy rates were significantly lower with the blastocyst group transfer. In conclusion, the results of this study support the blastocyst transfer in favor of a higher implantation potential and less risk of higher-order multiple pregnancies, decreasing the number of embryos transferred.

KEYWORDS

Embryo, blastocyst, day 3 embryo transfer, day 5 embryo transfer, in vitro fertilization, oocyte donation.

INTRODUCCIÓN

Se define a las técnicas de reproducción asistida (TRA) como los procedimientos que incluyen la asistencia de la fecundación y el desarrollo en humanos para el establecimiento de un embarazo (Zegers-Hochschild, Adamson, de Mouzon, Ishihara, Mansour & Nygren, 2009, pp. 2683-2687). Por lo tanto, es la alternativa en aquellas parejas que por causas femeninas, masculinas o ambas no logran un embarazo de manera espontánea.

El primer nacimiento mediante TRA ocurrió en 1978 (Steptoe & Edwards, 1978, pp. 366). Este evento marcó el inicio de una nueva era en el desarrollo de la medicina reproductiva. Desde entonces, han sido muchos los avances que van desde el cuidado de la paciente y estimulación de los ovarios hasta la mejora tecnológica en el laboratorio donde se cultivan los gametos y embriones (Portella & Steurer, 2013, pp. 608). El objetivo de estos avances es el éxito de la técnica, reflejado en la tasa de partos con nacidos vivos; es decir, el número de partos con bebés nacidos del total de procedimientos de TRA realizados (Zegers-Hochschild, Adamson, De Mouzon, Ishihara, Mansour & Nygren, 2009, pp. 2683-2687).

Asimismo, la edad de la mujer, impide que algunas puedan hacer uso de sus propios ovocitos para lograr embarazarse. En tal sentido, la donación de

ovocitos (OD) es una variante en las TRA, en la cual las mujeres jóvenes, sanas y fértiles en un acto altruista donan sus ovocitos para que otras mujeres se embaracen (Noriega, Fabrizio, Romero, Llerena & Prazak, 1998, pp. 9-15).

Actualmente, se reportan más de cinco millones de niños nacidos en el mundo mediante TRA (Kamel, 2013, pp. 96-109). Sin embargo, muchos de estos niños provienen de embarazos gemelares o de alto orden (tres o más fetos durante la gestación), hecho que puede resultar en una complicación médica, tanto para la madre como para el feto. La responsabilidad de la gestación múltiple o multigestación (dos o más fetos en la gestación) recae en el número de embriones que se transfieren al útero de la futura madre (El Kissi, Romdhane, Hidar, Bannour, Ayoubi Idrissi & Khairi, 2013, pp. 185-189), lo cual motivó que en algunos países se adopten políticas sobre esta problemática (El Kissi, Romdhane, Hidar, Bannour, Ayoubi Idrissi & Khairi, 2013, pp. 185-189; Cabello, Gomez-Palomares, Castilla, Hernandez, Marqueta & Pareja, 2010, pp. 667-675). Por esto, se hace importante poder contar con métodos de selección embrionaria, que permitan transferir el mínimo número de embriones sin arriesgar la probabilidad de lograr un embarazo (Sepúlveda, Portella, Noriega, Escudero, Noriega, 2011, pp. 195-199).

El objetivo del presente trabajo fue comparar las tasas de embarazo e implantación en un programa de dona bajo TRA cuando se transfieren embriones en día tres o día cinco de desarrollo. Asimismo, observar el efecto de la transferencia de un menor número de embriones y el impacto sobre las tasas de multigestación.

Conceptos básicos

El embrión preimplantacional

En la reproducción sexual, millones de espermatozoides (gameto masculino) son depositados en la vagina de la mujer. Solo aquellos espermatozoides con capacidad de movimiento podrán migrar a las trompas de Falopio. En este trayecto sufren una serie de transformaciones fisiológicas y moleculares que les van a conferir la capacidad fecundante. Si la mujer se encuentra en el día de la ovulación, un ovocito (gameto femenino) es liberado tras la ruptura del folículo ovárico dominante. El encuentro entre ovocito y espermatozoides se produce en el tercio externo de la trompa de Falopio, llamado ampulla o ampolla. Es aquí donde un espermatozoide ingresará y fecundará al ovocito generando una serie de eventos intracelulares que ocurren en el transcurso de horas. Este proceso es llamado fecundación y la formación de los pronúcleos, marca el inicio en el desarrollo del embrión preimplantacional, hasta su implantación en el útero (Sepúlveda & Portella, 2013, pp. 646).

En el humano, este periodo preimplantacional dura entre seis y siete días hasta su anidación en el útero. El embrión experimenta una serie de divisiones celulares, compactación y diferenciación celular, hasta formar el blastocisto, en el cual se distinguen por primera vez dos tipos celulares: la masa celular interna y el trofoblasto. En todo este tiempo el embrión no crece y mantiene su tamaño, aproximadamente 100 μm de diámetro en el humano. Sin embargo, el desarrollo embrionario es un proceso dinámico con un estricto control del tiempo que gobierna las divisiones celulares y eventos de activación de genes (Johnson & Day, 2000, pp. 57-63). El proceso de las divisiones es conocido como segmentación (Agostoni, 1993, pp. 15-25). Cuando el embrión se ha segmentado en ocho células o blastómeras en el tercer día de desarrollo, se inicia el proceso de compactación (Iwata, Yumoto, Sugishima, Mizoguchi, Kai, Iba, 2014, pp. 421-426). Hasta ese estado los blastómeros son esféricos y en la compactación los blastómeros adyacentes se aplanan unos contra otros (Sepúlveda & Portella, 2013, pp. 646.). Asimismo, en esta etapa comienza la activación del genoma propio del embrión (padre y madre), dado que desde la fecundación estuvo comandado por la maquinaria materna (Johnson & Day, 2000, pp. 57-63).

Al finalizar el paso por la trompa, en el día cuatro, el embrión es una mórula. En los blastómeros periféricos se establecen uniones zonulares, sellando así los espacios entre las células externas, que constituirán el trofoblasto. La acumulación de material en el citoplasma de las blastómeras se vacía a los espacios interblastoméricos o extraembrionario y se formará posteriormente la cavidad blastocélica (Sepúlveda & Portella, 2013, pp. 646). Es así que, la mórula compuesta de un solo tipo de células se transforma en un blastocisto, donde puede reconocerse la diferenciación de los blastómeros en dos tipos celulares. El trofoblasto, un epitelio aplanado, está constituido por los blastómeros periféricos; mientras que, la masa celular interna lo constituyen los blastómeros centrales, que queda desplazada hacia un polo. La masa celular interna dará origen al embrión propiamente tal y parte de los anexos embrionarios. El trofoblasto dará origen a la mayor parte de los anexos (Sepúlveda & Portella, 2013, pp. 646).

En la etapa de blastocisto, en el quinto día de desarrollo, el embrión debe escapar de una envoltura que lo rodea, llamada zona pelúcida y compuesta de varias glicoproteínas. Lo realiza mediante un efecto mecánico por la expansión de la cavidad blastocélica y un efecto químico por una enzima proteasa tipo tripsina que degrada esta envoltura. Todo este proceso se denomina eclosión. Una vez que el blastocisto eclosionó, buscará implantarse en la cavidad uterina. Para ello, se adhiere a la superficie del endometrio, lo invade y toma contacto con el sistema vascular de la madre. Posteriormente, habrá un desarrollo de la placenta y del embrión (Sepúlveda & Portella, 2013, pp. 646).

Técnicas de reproducción asistida

Las personas que recurren a las TRA lo hacen porque tienen dificultades para lograr un embarazo espontáneamente. Esta condición denominada infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo con la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más, de relaciones sexuales no protegidas (Zegers-Hochschild, Adamson, de Mouzon, Ishihara, Mansour, Nygren, 2009, pp. 2683-2687). En el 2010, un reporte estimó que 48.5 millones de parejas a nivel mundial tenían problemas de fertilidad (Mascarenhas, Flaxman, Boerma, Vanderpoel & Stevens, 2012, pp. 12).

El procedimiento de admisión para las TRA consiste en una evaluación para determinar la etiología de la infertilidad en la pareja. Según el resultado ayudará a predecir la probabilidad del embarazo y parto así como en la elección del tipo de tratamiento. La evaluación básica consiste de un apropiado análisis genético, prueba de reserva ovárica, examinación de la cavidad uterina y análisis de semen (Yen, Strauss, Barbieri & Jaffe's, 2009).

Durante el tratamiento de reproducción asistida, la mujer recibe un tratamiento hormonal para estimular el desarrollo de los folículos ováricos e incrementar el número de ovocitos, este proceso toma alrededor de 9 a 12 días. Posteriormente, cuando los folículos dominantes alcanzan un diámetro entre 17 y 18 mm se induce la ovulación. Aproximadamente, entre 34 a 36 horas después, se procede con la aspiración de los folículos mediante el uso de una aguja guiada por un transductor transvaginal. La imagen es proyectada a un ecógrafo. De cada folículo se aspira el contenido líquido, de tal manera que el ovocito se desprenda de la pared folicular.

El líquido folicular es recogido en un tubo estéril e inmediatamente es entregado al laboratorio de reproducción asistida, el cual se encuentra en una habitación contigua. Una vez dentro del laboratorio empieza la parte in vitro del proceso. El líquido es observado en un microscopio estereoscópico y se separan los ovocitos rodeados de células del cúmulo, llamado complejo cúmulo-corona-ovocito (CCO). Estos complejos CCO son lavados en medio de cultivo y colocados en las incubadoras a una temperatura de 37°C, similar a la temperatura corporal, hasta la inseminación.

Dentro de las técnicas de inseminación existe la fecundación in vitro (FIV) y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). En el procedimiento de la FIV, los ovocitos son fecundados por espermatozoides móviles recuperados mediante técnicas de separación espermática; de manera que, los procesos de fecundación y desarrollo embrionario preimplantacional, que ocurren normalmente dentro del cuerpo de la madre, se llevan a cabo en el laboratorio bajo condiciones adecuadas. La FIV está indicada en aquellas parejas en las cuales la mujer presenta ausencia u

obstrucción de una o ambas trompas de Falopio, falla ovárica natural o prematura, alteraciones leves en la función espermática (infertilidad masculina) o infertilidad sin causa aparente.

Por otro lado, en el procedimiento de la ICSI, de forma similar que en la FIV, los ovocitos son obtenidos por aspiración folicular y los espermatozoides son recuperados mediante técnicas de separación y/o lavados de acuerdo a las características de la muestra seminal. En la ICSI, se inyecta un solo espermatozoide al interior de cada ovocito maduro. Esta técnica está indicada en aquellas parejas en las cuales el embarazo no puede ser logrado por la FIV convencional; principalmente casos de infertilidad masculina severa (oligoastenoteratozoospermia severa), azoospermia obstructivas y no obstructivas (ausencia de espermatozoides en el eyaculado) y parejas que han realizado procedimientos previos de FIV con tasas bajas o nulas de fecundación.

Entre 16 a 18 horas después de la inseminación, ya sea por la técnica FIV o ICSI, se evalúa la fecundación de los ovocitos. Una fecundación normal se caracteriza por la presencia de dos cuerpos polares y dos pronúcleos (material genético de la madre y del padre). El cultivo in vitro de los embriones resultantes prosigue hasta la transferencia al útero o hasta su crio preservación, en un tiempo máximo de seis días.

La transferencia de los embriones a la madre se realiza con una pequeña sonda o catéter que pasa por la vagina, luego por el cuello uterino y finalmente llega al útero. Este procedimiento toma alrededor de cinco minutos y es un proceso indoloro, por lo tanto, no es necesario el uso de anestésicos. Los embriones que no son transferidos son crio preservados o vitrificados, siempre y cuando sean viables. Un consenso en un encuentro de expertos concluye que un embrión no es viable cuando el embrión se detiene en su desarrollo por al menos 24 horas, o cuando todas las células se han degenerado o lisado (The Istanbul consensus workshop on embryo assessment, 2011, pp. 1270-1283).

Edad materna y fertilidad

La edad tiene un efecto dramático en la capacidad reproductiva. En la actualidad, se observa una alta tendencia a postergar la maternidad en razón de un mayor desarrollo personal, económico y profesional de la mujer (Paredes & Horiz, 2013, pp. 45-50; Fuentes, Jesam, Devoto, Angarita, Galleguillos & Torres, 2010, pp. 1240-1245); lo cual, está conduciendo a una mayor incidencia de problemas de fertilidad relacionados a la edad (Maheshwari, Hamilton & Bhattacharya, 2008, pp. 538-42). Asimismo, el gran interés e investigación continua del impacto del estilo de vida, como el consumo de alcohol, tabaco y cafeína, nos evidencian de cómo estos factores alteran significativamente la fertilidad (Sharma, Biedenharn, Fedor & Agarwal, 2013, pp. 66).

La fecundidad femenina se ve mermada a partir de los 35 años de edad, con un mayor impacto después de los 40 años. Estos datos fueron tomados de registros históricos de fecundidad natural (Eijkemans, van Poppel, Habbema, Smith & Leridon, 2014, pp. 1304-1312) y confirmados por los registros generados tras TRA (Zegers-Hochschild, Schwarze, Crosby, Musri, Souza, 2013, pp. 216-223). Por otro lado, la menor probabilidad de lograr un embarazo exitoso relacionado al incremento en la edad materna está caracterizada por una disminución en la reserva folicular ovárica (Gurtcheff & Klein, 2011, pp. 666-674) y una mayor prevalencia de alteraciones cromosómicas en el ovocito (Fragouli, Wells & Delhanty, 2011, pp. 107-118). Como consecuencia, se reduce la implantación de los embriones en el útero de la madre, o si estos implantan, la probabilidad de un aborto espontáneo es mayor (Sepúlveda & Portella, 2012, pp. 207-11; Ljunger, Stavreus-Evers, Cnattingius, Ekbom, Lundin & Anneren, 2011, pp. 221-224). Además, el embarazo a una edad avanzada representa un factor de riesgo para complicaciones médicas y obstétricas (Tipiani-Rodríguez, 2006, pp. 179-185).

Donación de ovocitos

Además de las mujeres de edad materna avanzada con dificultades para tener un embarazo a término, están aquellas mujeres impedidas de procrear a causa de una anomalía de su sistema reproductor. Entre ellas están quienes han perdido su fertilidad como un resultado de tratamientos contra el cáncer, menopausia prematura o aquellas quienes temen usar sus propios ovocitos por ser portadoras de enfermedades genéticas.

La alternativa que nos presentan las TRA es la donación de ovocitos de una mujer a otra, permitiendo que mujeres sin función ovárica tengan la oportunidad de tener hijos. Lutjen, Trounson, Leeton, Findlay, Wood & Renou (1984, pp. 174-175) fueron los primeros en reportar el nacimiento de un bebé saludable luego de la OD a una mujer sin función ovárica. La OD está indicada en aquellas pacientes con falla ovárica natural o prematura, fallas repetidas en ciclos de FIV y desórdenes genéticos heredables. Las mujeres que donan sus ovocitos son jóvenes, sanas y fértiles. Por ello, las altas tasas de embarazo con ciclos de OD han permitido su difusión y aceptación en centros de reproducción (Noriega, Fabrizio, Romero, Llerena & Prazak, 1998, pp. 9-15; Sepúlveda, Portella, Noriega, Escudero & Noriega, 2011, pp. 195-199; Zegers-Hochschild, Schwarze, Crosby, Musri, Souza, 2013, pp. 216-223).

Cultivo *in vitro* prolongado hasta blastocisto

El cultivo *in vitro* de embriones requiere de un ambiente que permita sostener la fecundación y desarrollo de los gametos y embriones hasta que sean transferidos al útero materno. Este es un procedimiento complejo, que demanda un estricto control de calidad y un alto nivel de entrenamiento del

personal del laboratorio. Estas condiciones diseñadas en el laboratorio, que proveen los elementos físicos y químicos específicos para el desarrollo de los embriones preimplantacionales, es lo que denominamos un sistema de cultivo (Portella & Steurer, 2013, pp. 608). El principal protagonista de este sistema es el medio de cultivo, que en términos simples, es el ambiente líquido del cual el embrión se nutrirá y desarrollará. Además, existen otros componentes involucrados en el sistema de cultivo como las placas de cultivo, la temperatura, los gases, la incubadora y la calidad del aire.

Tradicionalmente, en los programas de reproducción asistida las transferencias embrionarias se han llevado a cabo con embriones en estadio de clivaje al segundo o tercer día después de la aspiración de ovocitos. El principal obstáculo fue la falta de formulaciones específicas del medio cultivo que soporten un desarrollo más allá del tercer día. Aunque, el primer nacimiento con la transferencia de un embrión de quinto día de desarrollo en estadio de blastocisto fue en 1985 (Cohen, Simons, Fehilly, Fishel, Edwards & Hewitt, 1985, pp. 647), no fue hasta 1998 que la composición de medios de cultivo facilitó el cultivo prolongado hasta el quinto o sexto día (Gardner, Vella, Lane, Wagley, Schlenker & Schoolcraft, 1998, pp. 84-88).

Una reciente revisión y metanálisis que compara la transferencia de blastocistos o embriones en estadio de clivaje en ciclos de FIV/ICSI encontró que la tasa de nacido vivo es significativamente mayor con la transferencia en blastocisto (Wang & Sun, 2014, pp. 815-825). Por el contrario, las tasas de multigestación y aborto temprano están a favor de la transferencia de embriones en estadio de clivaje; mientras que no existe diferencia en la tasa de embarazo ectópico entre ambos (Wang & Sun, 2014, pp. 815-825).

Hay varias ventajas a favor del cultivo hasta blastocisto. El cultivo prolongado nos permite distinguir entre los embriones viables con el mayor potencial de implantación de aquellos que se desarrollan inicialmente pero se detienen más tarde (Sepúlveda & Portella, 2013, pp. 646). Además, permite evidenciar aquellos embriones que lograron activar su genoma embrionario, avanzando más allá del estado de ocho células (Braude, Bolton, Moore & Human, 1988, pp. 459-461). Por otro lado, en condiciones in vivo, los embriones en estado de clivaje se encuentran normalmente en las trompas de Falopio y no en el útero. Por lo tanto, la transferencia de embriones en el estado de blastocisto está en sincronía con el ambiente uterino y resulta ser más fisiológico (Buster, Bustillo, Rodi, Cohen, Hamilton & Simon, 1985, pp. 211-217). Asimismo, las contracciones uterinas disminuyen progresivamente durante la fase lútea minimizando la posibilidad de que el embrión sea expulsado del útero (Fanchin, Ayoubi, Righini, Olivennes, Schonauer, Frydman, 2001, pp. 1115-1119). Otra ventaja es contar con menos embriones para criopreservar (Papanikolaou, Kolibianakis, Tournaye, Venetis, Fatemi & Tarlatzis, 2008, pp. 91-99).

Actualmente, el cultivo prolongado es requisito fundamental para realizar el diagnóstico genético preimplantacional en embriones en estadio de blastocisto. Para ello, un grupo de células del trofoblasto son biopsiadas y analizadas mediante la técnica de hibridación genómica comparada por microarreglos (aCGH). Los embriones con un diagnóstico normal tienen un mayor potencial de implantación sin importar la edad materna (Harton, Munne, Surrey, Grifo, Kaplan & McCulloh, 2013, pp. 1695-1703).

Ciertos riesgos o desventajas del cultivo prolongado de blastocisto deben ser advertidos a las parejas bajo tratamientos de reproducción asistida. La tasa de cancelación por falta de embriones a transferir puede alcanzar el 15% en pacientes mayores de 34 años (Sepúlveda, Portella, Noriega, Escudero, Noriega, 2011, pp. 195-199). Este hecho puede deberse al menor número de ovocitos recuperados durante la aspiración folicular y con ello, un menor número de embriones disponibles. Sin embargo, en pacientes jóvenes hasta los 34 años o en ciclos de OD, la tasa de cancelación por transferencia embrionaria representa el 3.7% y 1.5% de los casos (Cohen, Simons, Fehilly, Fishel, Edwards & Hewitt, 1985, pp. 647).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se estudiaron de manera retrospectiva 1667 ciclos de transferencia de embriones en pacientes sometidas a tratamientos de reproducción asistida con OD (Transferencia día 3: 594 ciclos; Transferencia día 5: 1073 ciclos), en los laboratorios de Reproducción Asistida del Grupo PRANOR en Lima, entre enero del 2004 y marzo del 2013. Se escogió la OD porque los ovocitos provienen de un grupo homogéneo en cuanto a edad de las donantes (18-34 años).

Cuando los ovocitos fueron obtenidos de las donantes, estos se asignaron a las pacientes receptoras de ovocitos. Todos los casos de donación fueron realizados de modo anónimo; tal que ni las donantes ni las receptoras de ovocitos se conocían. En este estudio se compararon las tasas de embarazo e implantación cuando la transferencia de embriones se realizó exclusivamente al tercer día de desarrollo o al quinto en estadio de blastocisto.

Criterios de inclusión

Procedimientos de FIV o ICSI con OD y transferencia de embriones en día 3 o día 5.

Criterios de exclusión

- a) Procedimientos de FIV o ICSI con OD y transferencia de embriones en día 2, 4 o 6.
- b) Procedimientos de FIV o ICSI con ovocitos de la paciente.
- c) Procedimientos con transferencia de embriones criopreservados o vitrificados. de FIV o ICSI con ovocitos de la paciente.
- d) Procedimientos con diagnóstico genético preimplantacional.

Estimulación ovárica y obtención de ovocitos

Las donantes de ovocitos fueron sometidas a diversos protocolos de estimulación ovárica controlada, utilizando la Hormona Folículo Estimulante recombinante (FSHr) exógena y/o la Gonadotropina Menopáusica Humana (HMG); o estas en combinación con el Agonista de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (a-GnRH) o el Antagonista de la GnRH (ant-GnRH). La respuesta folicular fue evaluada por ecografía transvaginal. La maduración final del ovocito fue inducida con la Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) o con a-GnRH (solo en ciclos ant-GnRH) cuando se observaron al menos dos folículos con un diámetro mayor o igual a 18 mm.

La punción folicular se realizó entre las 35-36 horas después de la aplicación hCG o a-GnRH. Los CCO fueron colectados y posteriormente cultivados a 37°C. Dependiendo del número de ovocitos obtenidos de cada donante, éstos fueron divididos al azar entre 1 a 4 pacientes antes de realizar la inseminación o inyección de los mismos.

Separación de espermatozoides, inseminación e inyección de ovocitos

El semen fue colectado por masturbación. Luego de la licuefacción, los espermatozoides con motilidad progresiva fueron separados del plasma seminal por centrifugación en gradientes de densidad.

Para la inseminación en la FIV convencional, aproximadamente 50,000 a 100,000 espermatozoides fueron cocultivados con uno a cinco ovocitos. Para la ICSI, los ovocitos fueron liberados de las células del cúmulo y corona mediante tratamiento enzimático (Sepúlveda, García, Arriaga, Díaz, Noriega-Portella & Noriega-Hoces, 2009, pp. 1765-1770). Solo se inyectaron aquellos ovocitos que estaban en metafase II.

Evaluación de la fecundación y cultivo embrionario

La fecundación fue evaluada 16 a 18 horas después de realizada la inseminación o inyección (día 1). Los ovocitos fecundados (2PN) fueron cultivados individualmente. La evaluación de la calidad embrionaria fue realizada diariamente o cada dos días. Las características evaluadas fueron el número de blastómeras, presencia de fragmentos citoplasmáticos, multinucleación, compactación y blastulación (Sepúlveda, García, Arriaga, Díaz, Noriega-Portella & Noriega-Hoces, 2009, pp. 1765-1770). Los embriones que desarrollaron a estadio de blastocisto fueron evaluados a su vez por calidad de la Masa Celular Interna (MCI) y Trofoblasto.

Pacientes receptoras de embriones

La preparación del endometrio en la paciente receptora de embriones, se realizó mediante la administración oral de valerianato de estradiol. Las pacientes receptoras necesitaban tener un grosor endometrial mínimo de 8 mm antes de recibir la progesterona. Ellas recibieron 600 mg de progesterona micronizada diariamente por vía vaginal, comenzando el día de la punción folicular de la donante de ovocitos hasta el día de la prueba de embarazo (cuantificación de la subunidad beta de la hCG). Si la prueba de embarazo fue positiva, la suplementación con progesterona fue continuada por dos meses más.

Transferencia embrionaria y determinación del embarazo

La transferencia de embriones fue realizada en el día 3 o en el día 5 del cultivo embrionario, dependiendo del caso. Se utilizó un catéter de transferencia Frydman Ultrasoft. De 12 a 14 días después de la transferencia embrionaria, el embarazo fue determinado por cuantificación de la subunidad beta de la hCG. Por ecografía transvaginal se observó la presencia de saco gestacional a los 21 días después de la transferencia embrionaria y latido cardíaco fetal al día 28, confirmando así el embarazo.

Definición de parámetros analizados

La tasa de embarazo fue definido como el número de ciclos con al menos un saco gestacional entre el número de ciclos transferidos por 100. La tasa de aborto fue definida como el número de embarazos con pérdida total de los sacos gestacionales antes de las 20 semanas de gestación entre el número de embarazos por 100. Para el cálculo de la tasa de implantación se tomó en cuenta el número de sacos amnióticos y sacos gestacionales entre el número total de embriones transferidos por 100. La tasa de embarazo múltiple corresponde al número de embarazos con dos o más sacos gestacionales entre el número de embarazos por 100. La tasa de embarazo múltiple de alto orden es definido como el número de embarazos con tres o más sacos gestacionales entre el número de embarazos por 100. La tasa de parto es

expresado como el número de embarazos a término con al menos un nacido vivo entre el número de ciclos transferidos por 100.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico STATA 12.0 (StataCorp LP, College Station, TX, USA). Se evaluó la distribución normal de los datos por la prueba de Shapiro Wilk. Los datos fueron sometidos a pruebas de distribución Chi-cuadrado de Pearson para las variables cualitativas, y el test *t* de Student para las cuantitativas. En caso de no tener una distribución normal se usaron pruebas no paramétricas. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se analizaron 1667 ciclos de OD en pacientes sometidas a TRA. En 594 ciclos, la transferencia embrionaria se realizó en el estadio de clivaje (día 3) y 1073 ciclos en el estadio de blastocisto (día 5). En la tabla 3.1 se muestran las características, tanto de las pacientes receptoras como de las donantes de ovocitos. No hubo diferencias significativas en cuanto a la edad de las donantes ni en la edad de la receptora de ovocitos en los grupos estudiados.

En la tabla 3.2 se presentan los resultados reproductivos de los ciclos de OD según el día de transferencia de embriones. El número promedio de embriones transferidos en día 3 fue significativamente mayor en comparación al día 5 (2.71 ± 0.51 vs 1.96 ± 0.19 ; $P < 0.0001$). Similarmente, las tasas de implantación, embarazo y parto fueron significativamente mayores cuando la transferencia fue realizada en el día 3 que en el día 5. No se observaron diferencias para la tasa de embarazo múltiple y la tasa de aborto entre ambos grupos; mientras que, la tasa de embarazo múltiple de alto orden fue significativamente menor con transferencias en el día 5.

La distribución de partos con nacido vivo de acuerdo al orden de gestación en los ciclos de OD según día de la transferencia de embriones (día 3 y 5) es mostrada en la tabla 3.3. La tasa de partos únicos y dobles fue similar en ambos grupos. Por el contrario, la tasa de parto triple o más fue significativamente mayor en el grupo de día 3 en comparación al grupo de día 5 ($P = 0.01$).

Tabla 3.1. Características de los ciclos de donación de ovocitos según día de la transferencia de embriones (día 3 y día 5)

Variable	DÍA 3	DÍA 5	P
Nº de ciclos	594	1073	
Edad de la donante en años rango*	24.88±3.03	24.79±3.0	NS
Edad de la receptora en años rango*	41.11±4.86	41.01±5.08	NS

*Los datos son expresados media ± desviación estándar NS = no significativo

Tabla 3.2. Resultados reproductivos en los ciclos de donación de ovocitos según día de la transferencia de embriones (días 3 y 5)

Variable	DÍA 3	DÍA 5	P
N° de embriones transferidos*	2.71±0.51	1.96±0.19	<0.0001
Tasa de embarazo ¹	51.01%	61.70%	<0.0001
Tasa de embarazo múltiple ²	44.88%	41.99%	NS
Tasa de embarazo múltiple de alto orden ²	9.24%	0.60%	<0.0001
Tasa de implantación ³	29.09%	44.85%	<0.0001
Tasa de aborto ²	13.20%	14.35%	NS
Tasa de parto ¹	44.28%	52.19%	0.0021

*Los datos son expresados media ± desviación estándar

¹En relación al total de ciclos.

²En relación al total de embarazos.

³En relación al total de embriones transferidos.

NS = no significativo

Tabla 3.3. Distribución de partos con nacido vivo de acuerdo al orden de gestación en los ciclos de donación de ovocitos según día de la transferencia de embriones (días 3 y 5).

Variable	DÍA 3	DÍA 5	P
N° de partos	263	560	
Únicos	57.03%	60.18%	NS
Dobles	35.36%	38.57%	NS
Triples o mayor	7.60%	1.25%	0.01

NS = no significativo

DISCUSIÓN

La multigestación es una de las grandes complicaciones en las TRA, dado que conlleva a morbilidad materna y perinatal. El factor principal que contribuye con esta problemática es el alto número de embriones transferidos durante los ciclos de TRA con el objetivo de incrementar las tasas de embarazo. Por lo cual, los esfuerzos para evitarla se centran en la reducción del número de embriones transferidos, siendo el objetivo final la transferencia de un único embrión (Pandian, Marjoribanks, Ozturk, Serour & Bhattacharya, 2013, pp. 7). Para ello, debemos seleccionar aquellos embriones con el mayor potencial de implantación. Esta transferencia de embriones en estadio de blastocisto es un método sugerido para reducir los embarazos múltiples de alto orden sin afectar la tasa de embarazo global (Esinler, Bozdag & Karakoc Sokmensuer, 2014, pp. 75-79).

En este estudio podemos observar que si bien un menor número de embriones son transferidos en el día 5 en comparación al día 3, las tasa de

embarazo e implantación se incrementan significativamente. Esto demuestra que los embriones en estadio de blastocisto (día 5) tienen un mayor potencial de implantación que los embriones en estadio de clivaje (día 3). Por el contrario, la tasa de embarazo múltiple de alto orden (3 o más sacos), que debe ser evitado en las TRA, se reduce significativamente con la transferencia en día 5.

Los primeros ensayos prospectivos y aleatorizados, que compararon las transferencias de día 3 y día 5, usaron medios de cultivo secuenciales y concluyeron que la transferencia en día 5 reduce significativamente la tasa de embarazo múltiple de alto orden, siendo suficiente la transferencia de dos embriones (Gardner, Schoolcraft, Wagley, Schlenker, Stevens & Hesla, 1998, pp. 3434-3440; Scholtes & Zeilmaker, 1996, pp. 1245-1248). Aunque estos reportes fueron realizados en pacientes con sus propios ovocitos, años más tarde se publicaron los resultados en el programa de OD, donde concluyeron el mismo beneficio de la transferencia en estadio de blastocisto (Schoolcraft & Gardner, 2000, pp. 482-486). Además, sugirieron el cambio a la transferencia de un único embrión debido a las altas tasas de implantación mostradas con la transferencia en día 5 (Schoolcraft & Gardner, 2000, pp. 482-486).

Diferentes autores han descrito diversos criterios de inclusión para prolongar el cultivo embrionario y transferir en el estadio de blastocisto en pacientes seleccionadas; así se tiene, el número de folículos (>10) en el momento de la administración de la hCG (39), número de ovocitos aspirados (Scholtes & Zeilmaker, 1998, pp. 78-83), al menos cuatro embriones de buena calidad en el día 3 de desarrollo (Papanikolaou, D'Haeseleer, Verheyen, Van de Velde, Camus & Van Steirteghem, 2005, pp. 3198-203). Sin embargo, Wilson, Hartke, Kiehl, Rodgers, Brabec & Lyles (2002, pp. 693-696) demostraron que la transferencia de blastocistos puede ser aplicable a cualquier paciente, incluso en ciclos de OD, sin comprometer la probabilidad de la transferencia embrionaria o el embarazo.

En el presente estudio hasta el 2007, la decisión de prolongar el cultivo embrionario hasta el quinto día fue tomada en el tercer día de desarrollo de cada ciclo mediante un consenso médico-paciente y el laboratorio de reproducción asistida. Para ello, el criterio principal a ser considerado en la decisión era el número y calidad morfológica de los embriones disponibles. A partir del año 2008, la gran mayoría de transferencias se realizaban en el día 5 independientemente de los criterios anteriormente mencionados.

Se han descrito diversas estrategias morfológicas desde el estadio de cigoto hasta el tercer día de desarrollo para seleccionar embriones con cierto valor predictivo de su potencial implantatorio. Sin embargo, este valor puede ser limitado por el hecho de que los embriones de estos estadios dependen en gran parte del genoma materno, dado que el genoma embrionario está

completamente activado después del estadio de ocho células que corresponde al tercer día de desarrollo (Braude, Bolton & Moore, 1988, pp. 459-461). Esto representa un punto en contra de la transferencia de embriones en día 3. Por otro lado, la morfología embrionaria en el día 3 de desarrollo no predice la formación de un blastocisto cuando se prolonga el cultivo de los embriones hasta el quinto o sexto día (Porat, Boehnlein, Barker, Kovacs & Lindheim, 2010, pp. 357-363). De tal modo que, el cultivo hasta el estadio de blastocisto es el determinante para mejorar el resultado reproductivo en ciclos de OD (Wilson, Hartke, Kiehl, Rodgers, Brabec & Lyles, 2002, pp. 693-696; Porat, Boehnlein, Barker, Kovacs & Lindheim, 2010, pp. 357-363).

Los ciclos de OD permiten estudiar el efecto paterno sobre el desarrollo embrionario y posterior embarazo, ya que los ovocitos al ser de mujeres jóvenes presentan una mejor calidad y gran capacidad de reparación de daño del material genético. Diversos autores han mostrado el efecto paterno en el desarrollo embrionario preimplantacional, desde el estadio de 4-8 blastómeras hasta el estadio de blastocisto, apoyando el hecho de la expresión tardía del genoma paterno en la activación del genoma embrionario. Asimismo, la fragmentación del ADN del espermatozoide ha sido relacionada negativamente con el desarrollo embrionario y con las tasas de embarazo (Fernández-González, Moreira, Pérez-Crespo, Sánchez-Martin, Ramírez & Pericuesta, 2008, pp. 761-72; Tandara, Bajic, Tandara, Bilic-Zulle, Sunj & Kozina, 2014). Además, la fragmentación del ADN del espermatozoide fue asociada con una mayor probabilidad de aborto espontáneo (Robinson, Gallos, Conner, Rajkhowa, Miller & Lewis, 2012, pp. 2908-2917; Khadem, Poorhoseyni, Jalali, Akbary & Heydari, 2014, pp. 126-130).

El número máximo de embriones transferidos en estadio de blastocisto en este estudio fueron dos. Sin embargo, podemos observar que existen algunos casos de embarazo múltiple de alto orden en este grupo. Esto se debe a la división de los blastocistos originando gemelos monocigóticos y ocurre en siete embarazos. Del mismo modo, dos casos de monocigosidad fueron observados con la transferencia de embriones en estadio de clivaje. Aunque, en este estudio no se asocia la ocurrencia de gemelos monocigóticos con la transferencia de blastocisto, otros autores reportaron un riesgo incrementado de monocigosidad con el cultivo prolongado hasta quinto día, ovocitos donados, entre otros factores (Luke, Brown, Wantman & Stern, 2014, pp. 683-689).

CONCLUSIÓN

En ciclos de donación de ovocitos, la transferencia de embriones, en estadio de blastocisto correspondiente al día, 5 resulta que se obtiene mayores tasas de implantación y embarazo. Así, un máximo de dos blastocistos transferidos reducirá la tasa de embarazo múltiple de alto orden, aunque

debería implementarse la transferencia de un embrión único para evitar o al menos reducir el riesgo de embarazo gemelar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostoni, E. (1993). Preimplantation development of the mammalian embryo. En: *Annali dell' Istituto Superiore di Sanita*, 29(1), 15-25.

Balaban, B. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. En: *Human Reproduction*, 26(6), 1270-1283.

Braude, P., Bolton, V. & Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. En: *Nature*, 332(6163), 459-461.

Buster, J., Bustillo, M., Rodi, I., Cohen, S., Hamilton, M., Simon, J., et al. (1985). Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. En: *American journal of obstetrics and gynecology*, 153(2), 211-217.

Cabello, Y., Gomez-Palomares, J., Castilla, J., Hernández, J., Marqueta, J., Pareja, A., et al. (2010). Impact of the Spanish Fertility Society guidelines on the number of embryos to transfer. En: *Reproductive biomedicine online*, 21(5), 667-75.

Cohen, J., Simons, R., Fehilly, C., Fishel, S., Edwards, R., Hewitt, J., et al. (1985). Birth after replacement of hatching blastocyst cryopreserved at expanded blastocyst stage. En: *Lancet*, 1(8429), 647.

Eijkemans, M., van Poppel, F., Habbema, D., Smith, K., Leridon, H. & Te Velde, E. (2014). Too old to have children? Lessons from natural fertility populations. En: *Human Reproduction*, 29(6), 1304-1312.

El Kissi, Y., Romdhane, A., Hidar, S., Bannour, S., Ayoubi, K., Khairi, H., et al. (2013). General psychopathology, anxiety, depression and self-esteem in couples undergoing infertility treatment: a comparative study between men and women. En: *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 167(2), 185-189.

Esinler, I., Bozdog, G. & Karakoc, L. (2014). Mandatory single embryo transfer policy dramatically decreases multiple pregnancy rates. En: *The journal of obstetrics and gynaecology research*, 40(1), 75-79.

Fanchin, R., Ayoubi, J., Righini, C., Olivennes, F., Schonauer, L. & Frydman, R. (2001). Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. En: *Human Reproduction*, 16(6), 1115-1119.

Fernandez, R., Moreira, P., Perez, M., Sanchez, M., Ramirez, M., Pericuesta, E., et al. (2008). Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. En: *Biology of reproduction*, 78(4), 761-772.

Fragouli, E., Wells, D. & Delhanty, J. (2011). Chromosome abnormalities in the human oocyte. En: *Cytogenetic and genome research*, 133(2-4), 107-118.

Fuentes, A., Jesam, C., Devoto, L., Angarita, B., Galleguillos, A., Torres, A., et al. (2010). Postergación de la maternidad en Chile: Una realidad oculta. En: *Revista de medicina de Chile*, 138(10), 1240-1245.

Gardner, D., Schoolcraft, W., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J. & Hesla, J. (1998). A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. En: *Human Reproduction*, 13(12), 3434-3440.

Gardner, D., Vella, P., Lane, M., Wagley, L., Schlenker, T. & Schoolcraft, W. (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. En: *Fertility and sterility*, 69(1), 84-88.

Gurtcheff, S. & Klein, N. (2011). Diminished ovarian reserve and infertility. En: *Clinical obstetrics and gynecology*, 54(4), 666-674.

Harton, G., Munne, S., Surrey, M., Grifo, J., Kaplan, B., McCulloh, D., et al. (2013). Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. En: *Fertility and sterility*, 100(6), 1695-1703.

Iwata, K., Yumoto, K., Sugishima, M., Mizoguchi, C., Kai, Y., Iba, Y., et al. (2014). Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. En: *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(4), 421-426.

Johnson, M. & Day, M. (2000). Egg timers: how is developmental time measured in the early vertebrate embryo? En: *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(1):57-63.

Kamel, R. (2013). Assisted Reproductive Technology after the Birth of Louise Brown. En: *Journal of reproduction & infertility*, 14(3), 96-109.

Khadem N, Poorhoseyni A, Jalali M, Akbary A, Heydari ST. (2014). Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. En: *Andrologia*, 46(2), 126-130.

Ljunger, E., Stavreus-Evers, A., Cnattingius, S., Ekbom, A., Lundin, C., Anneren, G., et al. (2011). Ultrasonographic findings in spontaneous miscarriage: relation to euploidy and aneuploidy. En: *Fertility and sterility*, 95(1), 221-224.

Luke, B., Brown, M., Wantman, E. & Stern, J. (2014). Factors associated with monozygosity in assisted reproductive technology pregnancies and the risk of recurrence using linked cycles. En: *Fertility and sterility*, 101(3), 683-689.

Lutjen, P., Trounson, A., Leeton, J., Findlay, J., Wood, C. & Renou, P. (1984). The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. En: *Nature*, 307(5947), 174-175.

Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. En: *PLOS medicine*, 9(12).

Maheshwari, A., Hamilton, M. & Bhattacharya, S. (2008). Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. En: *Human Reproduction*, 23(3), 538-542.

Noriega, L., Fabrizio, V., Romero, R., Llerena, G. & Prazak, L. (1998). Ovodonación en el Perú: dos años de experiencia. Primeros resultados de fertilización in vitro-transferencia embrionaria con ovocitos donados. En: *Ginecología y Obstetría (Perú)*, 44(1), 9-15.

Pandian, Z., Marjoribanks, J., Ozturk, O., Serour G. & Bhattacharya, S. (2013). Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. En: *The Cochrane database of systematic reviews*.

Papanikolaou, E., D'Haeseleer, E., Verheyen, G., Van de Velde, H., Camus, M., Van Steirteghem, A., et al. (2005). Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. En: *Human Reproduction*, 20(11), 3198-3203.

Papanikolaou, E., Kolibianakis, E., Tournaye, H., Venetis, C., Fatemi, H., Tarlatzis, B., et al. (2008). Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. En: *Human Reproduction*, 23(1), 91-99.

Paredes, N. (2013). Maternidad postergada. En: *Horizonte Medico*, 1(13), 45-50.

Portella, J. & Steurer, I. (2013). Sistemas de cultivo. In: Noriega L, Llerena G, Prazak L, (ed.). Tratado de Reproducción Humana Asistida. Lima: Grupo Pranor, 608.

Porat, N., Boehnlein, L., Barker, M., Kovacs, P. & Lindheim, S. (2010). Blastocyst embryo transfer is the primary determinant for improved outcomes in oocyte donation cycles. En: The journal of obstetrics and gynaecology research, 36(2), 357-363.

Scholtes, M. & Zeilmaker, G. (1996). A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. En: Fertility and sterility, 65(6), 1245-1248.

Scholtes, M. & Zeilmaker, G. (1998). Blastocyst transfer in day-5 embryo transfer depends primarily on the number of oocytes retrieved and not on age. En: Fertility and sterility, 69(1), 78-83.

Schoolcraft, W. & Gardner, D. (2000). Blastocyst culture and transfer increases the efficiency of oocyte donation. En: Fertility and sterility, 74(3), 482-486.

Sepulveda, S., Garcia, J., Arriaga, E., Diaz, J., Noriega, LG. & Noriega L. (2009). In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. En: Fertility and sterility, 91(5), 1765-1770.

Sepúlveda, S. & Portella, J. (2013). Desarrollo embrionario in vitro y cultivo extendido hasta blastocisto. En: Mackenna A. (ed.). Reproducción humana e infertilidad. 1st ed. Santiago de Chile: Mediterráneo, 646.

Sepúlveda, S. & Portella, J. (2012). Diagnóstico genético preimplantacional: Alcances y límites. Revista peruana de ginecología y obstetricia, 58(3), 207-211.

Sepulveda, J., Portella, J., Noriega, LP., Escudero, E. & Noriega, LH. (2011). Extended culture up to the blastocyst stage: a strategy to avoid multiple pregnancies in assisted reproductive technologies. En: Biological research. 44(2), 195-9.

Sharma, R., Biedenharn, K., Fedor, J. & Agarwal, A. (2013). Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. En: Reproductive biology and endocrinology: RB&E, 11(66).

Stephens, P. & Edwards, R. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet, 2(8085), 366.

Tandara, M., Bajic, A., Tandara, L., Bilic-Zulle, L., Sunj, M., Kozina, V., et al. (2014). Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. En: *Andrology*.

Tipiani, O. (2006). ¿Es la edad materna avanzada un factor de riesgo independiente para complicaciones materno-perinatales? En: *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 52(3), 179-185.

Wang, S. & Sun, H. (2014). Blastocyst transfer ameliorates live birth rate compared with cleavage-stage embryos transfer in fresh in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection cycles: reviews and meta-analysis. En: *Yonsei medical journal*, 55(3), 815-825.

Wilson, M., Hartke, K., Kiehl, M., Rodgers, J., Brabec, C. & Lyles, R. (2002). Integration of blastocyst transfer for all patients. En: *Fertility and sterility*, 77(4), 693-696.

Yen SSC, Strauss JF, Barbieri RL. (2009). Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management. (6th ed.) En: Jerome F. Strauss III, Robert L. Barbieri. (ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier.

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., et al. (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology. En: *Human Reproduction*, 24(11), 2683-2687.