

Asociación entre la calidad de blastocistos y los resultados en la transferencia de un único blastocisto en ciclo diferido

Anahí D'Agostino, Camila Frautschi, Constanza Peretti, Mariana Hernández, Gustavo Estofan, Andrea Dematteis

Chacabuco 1089. Córdoba 5000. CIGOR (Centro Integral de Ginecología, Obstetricia y Reproducción). Córdoba, Argentina.

Reproducción 2019;34(1):7-15

Resumen

Objetivos. Evaluar la concordancia entre operadoras en la clasificación de blastocistos. Determinar si el criterio de clasificación usado tiene valor para predecir la implantación. **Materiales y métodos.** Se analizaron retrospectivamente 645 transferencias de blastocistos únicos desvitrificados de día 5 y 6, entre enero de 2015 y abril de 2018, en pacientes de 35-38 años y pacientes < 35 años y receptoras.

Calidad del blastocisto evaluada en la transferencia según criterio de Gardner (expansión, masa celular interna - MCI -, y trofoectodermo - TE -). Se evaluó: La concordancia interoperador para clasificación; la proporción e implantación de blastocistos de buena calidad ($\geq 3BB$) según edad ovocitaria y día de desarrollo 5-6; el valor predictivo de la clasificación, según la tasa de implantación de las categorías de morfología. **Resultados.** La concordancia entre operadores fue 99%, 83%, 87%

y 69% para evaluación de expansión, MCI, TE y blastocisto completo. Pacientes añosas tuvieron menos proporción de buenos blastocistos. No hubo diferencias de implantación de blastocistos $\geq 3BB$ según edad o día de desarrollo. Las morfologías consideradas mejores tuvieron mayores tasas de implantación. **Conclusión.** Este trabajo confirma la validez de la clasificación para evaluar la viabilidad de blastocistos descongelados en día 5-6, con concordancia entre operadores y capacidad para predecir implantación.

Palabras claves. Blastocistos criopreservados, morfología, implantación, MCI, TE.

Association between the blastocyst quality and the results in the transfer of a single blastocyst in deferred cycle

Summary

Objectives. To evaluate inter-operator variability in blastocyst classification. To determine if the classification criteria used has predictive value for further implantation. **Design.** Retrospective. **Materials and methods.** 645 transfers of thawed single day 5-6 blastocysts, performed between January 2015 and April 2018, in patients aged 35-38 years and patients <35 years plus oocyte recipients were retrospectively analyzed. Blastocyst quality was evaluated during the transfer, according to Gardner

Correspondencia: Anahí D'Agostino
Tel: +54 351 3848671
Correo electrónico: anahidagos@hotmail.com

criteria (expansion, internal cell mass – ICM - and trophoctoderm – TE -). We evaluated: inter-operator concordance for classification; proportion and implantation of good quality blastocysts ($\geq 3BB$) according to oocyte age and day of development; predictive value of the classification, according to the implantation rate of the morphology categories. Results. The concordance between operators was 99%, 83%, 87% and 69% for expansion, ICM, TE and complete blastocyst evaluation. Older patients had a lower proportion of good blastocysts. There were no differences in blastocyst $\geq 3BB$ implantation according to age or day of development. Blastocysts showing better morphologies had higher implantation rates. Discussion. This paper confirm the validity of the classification criteria used to evaluate the viability of thawed blastocysts on day 5-6, showing agreement between operators and ability to predict implantation.

Key words. Cryopreserved blastocyst, morphology, implantation, ICM, TE.

Introducción

Los avances en los sistemas de cultivo embrionario han facilitado el cultivo a blastocisto y la transferencia en día 5 o 6. Esto ha sido asociado a un aumento de las tasas de embarazo e implantación.¹⁻⁴ Además, se ha reducido significativamente el porcentaje de embarazos múltiples gracias a la tendencia cada vez más creciente de transferir un único blastocisto de buena calidad.⁴⁻⁶ La transferencia de un único embrión seleccionado depende no solo de un buen sistema de cultivo, sino también de la habilidad para identificar el blastocisto de mejor calidad en una cohorte, lo cual se presenta como un desafío y una prioridad.⁷ A raíz de esta necesidad, se han desarrollado varios criterios de clasificación de blastocisto. La evaluación de los tres componentes principales del desarrollo del blastocisto (grado de expansión, masa celular interna (MCI) y trofoectodermo (TE)) son la esencia de la mayoría de ellos.

Una escala de clasificación ampliamente aceptada es la propuesta por Gardner y col. en el 2000.⁴ El modelo de clasificación propuesto por

estos autores es alfanumérico, con base en el grado de expansión del blastocito (1 a 6, desde menos expandido a más expandido, respectivamente) y en la calidad y grado de desarrollo de la MCI y del TE (A a C, desde mejor calidad a peor calidad, respectivamente).

No obstante, a medida que se fue extendiendo el uso del cultivo a blastocito, se fue ampliando y/o modificando el criterio de Gardner.⁴ Por ejemplo, la escala de Gardner fue modificada mediante el desarrollo de una “puntuación de calidad de blastocisto” (blastocyst quality score, BQS), multiplicando la tasa de expansión (1 a 6) por la puntuación de la MCI (convirtiendo A, B y C en 3, 2 y 1, respectivamente), haciendo lo mismo con la puntuación del TE.⁸

El consenso de Estambul⁹ propuso en 2011 una clasificación numérica para grado de expansión, MCI y TE, equivalente al criterio de Gardner, pero que facilitaba los análisis estadísticos al representar la morfología a través de números. Por ejemplo, la clasificación A de Gardner para MCI y TE es propuesta con el número 1 (buena) por el consenso de Estambul.⁹

Por otro lado, ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción)¹⁰ también desarrolló criterios de valoración de blastocistos para los mismos aspectos que Gardner y col.

Shapiro y col.¹¹ demostraron que el momento de desarrollo del blastocito y el grado de expansión son predictores importantes del potencial de implantación del blastocisto. Otros autores mostraron una fuerte correlación entre los resultados clínicos (tasa de embarazo, implantación y embarazo múltiple) y la clasificación morfológica del blastocisto.^{4, 12, 13}

Se ha estudiado la relación de la MCI y el TE por separado y los resultados de reproducción asistida. Algunos autores demostraron que la calidad del TE guarda relación con la tasa de implantación,¹⁴⁻¹⁶ mientras que otros no encontraron relación entre el TE y la viabilidad embrionaria.¹⁷

Varios estudios han mostrado una correlación positiva entre la morfología de la MCI y los resultados clínicos. La hipótesis planteada es que a mayor tamaño de MCI, mayor chance de implantación exitosa.^{17, 18}

El desafío de lograr una clasificación que refleje correctamente el potencial del blastocisto

requiere además un buen entrenamiento a nivel individual y grupal (dentro de cada laboratorio).

A raíz de lo mencionado, durante la puesta a punto del programa de cultivo a blastocisto en nuestro centro, tomamos el criterio de evaluación de Gardner,⁴ para ser aplicado por cuatro personas. El uso del criterio debe ser validado de modo tal que, siempre que se use, tenga capacidad de predecir los resultados, y que exista acuerdo entre operadores sobre la clasificación de cada blastocisto.

Los objetivos de este trabajo son:

Evaluar la concordancia entre operadores en la clasificación de blastocistos de día 5 y día 6.

Determinar el **valor predictivo del criterio de clasificación** usado, evaluando la relación entre la calidad de blastocistos en día 5 y día 6 y los resultados en transferencia de un único blastocisto en ciclo diferido.

Materiales y métodos

Población de estudio

Para el presente trabajo se analizaron retrospectivamente los resultados obtenidos a partir de pacientes que realizaron ciclos de ART, y que se transfirieron blastocistos desvitrificados entre enero del 2015 y abril del 2018. Los criterios de inclusión fueron: pacientes hasta 38 años, ovocitos frescos propios o pacientes de ovodonación en fresco, espermatozoides de eyaculado o biopsia testicular, que criopreservaron uno o más blastocistos. Quedaron excluidas aquellas pacientes que realizaron PGT-A o que presentaron anomalías uterinas mullerianas.

Estimulación ovárica, sistema de cultivo y criopreservación

La estimulación ovárica se realizó con esquema de antagonista de GnRH. Se realizaron controles periódicos ecográficos y de estradiol sérico. Se aplicó el antagonista con folículos iguales o mayores a 14 mm. Cuando se alcanzó el desarrollo folicular de tres folículos de 18 mm o más se administró 10.000 UI de HCG.

En el laboratorio, se utilizó medio HTF con hepes suplementado (Irvine SC) para la recuperación de ovocitos, procesamiento y resuspensión de espermatozoides e ICSI. Las muestras de se-

men fueron procesadas por *swim-up*, gradientes de densidad (Isolate, Irvine SC) o centrifugación.

Los ovocitos y embriones se cultivaron de manera individual en microgotas de 20 µl bajo aceite, en medios secuenciales (Vitrolife o Sage). Se usaron dos tipos de incubadoras: convencional (Forma, Thermo Scientific) y trigas (K-system), ajustando el CO₂ para cada medio de cultivo, de modo tal que se lograra un pH entre 7,2 y 7,3.

Los blastocistos se vitrificaron y desvitrificaron con medios, soportes y protocolos de Cryotech lab, modificados del método de cryotop.¹⁹

Ciclo de desvitrificación y transferencia

Se transfirió en endometrios estimulados o ciclo natural, según criterio médico, preparando el endometrio para un día 5 de transferencia, tanto para blastocistos de día 5 o 6. Los blastocistos se desvitrificaron 2 a 4 h antes de la transferencia, se los clasificó y se les realizó hatching (AH). Al momento de la transferencia se los clasificó nuevamente y esta clasificación es la que se tuvo en cuenta para el análisis.

Criterio de clasificación de los blastocistos

A cada blastocisto se le asignó un puntaje numérico del 1 al 6 para expresar el **grado de expansión y de extrusión de la zona pelúcida** (1: blastocisto temprano, con un blastocele que ocupa menos de la mitad del volumen del embrión; 2: el blastocele ocupa la mitad o más del volumen del embrión; 3: el blastocele ocupa el total del volumen, pero la zona pelúcida no se observa adelgazada; 4: blastocisto expandido, ocupando un volumen mayor al inicial y su zona pelúcida se observa adelgazada; 5: el blastocisto comienza a eclosionar; 6: el blastocisto está totalmente fuera de la zona pelúcida).⁴

En blastocistos con grado de expansión 3 o más, la MCI y el TE se clasificaron de la siguiente manera: la **MCI** fue clasificada a través de las letras A, B y C, reflejando mejor a peor calidad, respectivamente (A: numerosas células compactadas, formando una masa de forma oval; ¹⁷ B: menor número de células, menos compactadas; C: pocas células, no compactadas).⁴

Para realizar una evaluación más objetiva de cuánto es “numeroso” y “pocas células”, se agregaron los tamaños propuestos por ASEBIR¹⁰ de: un diámetro entre 1900 y 3800µm² para MCI tipo A y

B (diámetros comparables al tamaño de blastómeras en estadio de 8 y 4 células respectivamente); y un diámetro menor a $1900 \mu\text{m}^2$ para MCI tipo C.

El **TE** también fue clasificado con letras A, B y C, reflejando mejor a peor calidad, respectivamente (A: numerosas células formando un epitelio cohesivo y homogéneo de células elípticas; B: menor número de células, formando un epitelio menos cohesivo y heterogéneo; C: epitelio irregular, con células escasas).

Durante la evaluación de concordancia entre biólogas, se usó la letra X para MCI y TE que no se pudieron clasificar por escasa visión en las fotos.

La mayoría de las veces, la evaluación fue realizada por un solo biólogo. No obstante, siempre que fue posible se realizó el análisis de la calidad entre dos biólogos, siendo la clasificación final consensuada por ambos.

Concordancia interoperador en clasificación de blastocistos

Para evaluar la concordancia entre operadores en el uso del criterio alfanumérico de clasificación utilizado, se observaron fotografías de blastocistos de días 5 y 6, y se registró la clasificación individual de cada una de las cuatro biólogas. Luego se calculó el porcentaje de concordancia para cada blastocisto y para sus componentes individuales (grado de expansión, calidad de MCI, TE y blastocisto en su totalidad).

La concordancia interoperador para los parámetros clasificados se registró de la siguiente manera: 100%= todas clasificaron igual; 75%= 3 iguales, 1 desigual; 50%= 2 iguales + 2 iguales; 33%=2 iguales vs. 1 desigual + 1 desigual; 0%= 4 diferentes.

Análisis de resultados de transferencia de un único blastocisto en ciclo diferido

Este trabajo analiza 645 transferencias de blastocisto único, en las que se lograron 231 embarazos, de los cuales 3 fueron múltiples. Comprende pacientes de hasta 38 años y receptoras de ovocitos (de donantes menores de 35 años).

Para evaluar si la amplitud de rango de edad de las pacientes afecta la calidad de blastocitos y los resultados, separamos la población de ovocitos en dos grupos de acuerdo con la edad biológica: pacientes de 35-38 años y pacientes menores de 35 años y receptoras. Comparamos entre estos gru-

pos la proporción de blastocistos de buena calidad obtenidos (3BB o mejor) y las tasas de implantación luego de transferencia.

Todas las transferencias fueron de blastocisto único. Para el análisis estadístico, cada embarazo múltiple se consideró como 1 blastocisto implantado, de forma tal que la tasa de implantación en este caso es igual a la tasa de embarazo clínico. El análisis estadístico se realizó mediante test de Chi-cuadrado. Un $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

De acuerdo con el criterio de evaluación utilizado, hay al menos 38 categorías posibles de clasificación: (1-, 2-, 3AA, 3AB, 3AC, 3BA, 3BB, 3BC, 3CA, 3CB, 3 CC, 4AA, etc., 5AA, etc., 6AA, etc.).

Durante el trabajo, se reagruparon los blastocistos como 1-, 2-, y luego, para cada grado de desarrollo 3 a 6, en AA, AB/BA, BB, BC/CB, CC, dando 22 categorías posibles.

La cantidad de categorías y el N de nuestra población hacen que no podamos analizar estadísticamente las diferencias obtenidas entre los resultados.

Resultados

Concordancia interoperador en clasificación de blastocisto

Al clasificar los blastocistos según el criterio adoptado por nuestro laboratorio, se observó un 69% de concordancia promedio entre biólogas. El grado de expansión fue el componente que obtuvo un mayor consenso interoperador (99%), mientras que la MCI fue la que mostró menor concordancia (83%). El TE fue clasificado de la misma manera por todas las biólogas en el 87% de los blastocistos.

Para aquellos casos en los que la MCI era A, hubo un 90% de concordancia, mientras que para aquellos casos en los que el TE era A, la concordancia fue de 80%. En los casos en los que se consideró MCI tipo B, la coincidencia fue de 76%, y en el caso de TE tipo B fue de 90%, haciéndose visible la importancia de estandarizar los detalles que delimiten una clasificación u otra (por ejemplo, tamaño de la MCI).

Transferencia de un único blastocisto en ciclo diferido

Al analizar los resultados de los dos grupos comparados: pacientes de 35 - 38 años (ovocitos propios) y menores de 35 años (ovocitos propios y receptoras de ovocitos de donantes menores de 35 años), se observó que:

1) El grupo de pacientes más jóvenes tuvo mayor proporción de blastocistos de buena calidad.

2) Entre ambos grupos, al transferirse blastocistos de buena calidad, las tasas de embarazo fueron comparables. Lo mismo ocurre cuando se trasfiere

un blastocisto de calidad menor a 3BB (Tabla 1).

De acuerdo con el día de desarrollo de los blastocistos, al comparar las tasas de implantación (TI) obtenidas luego de la transferencia de blastocistos de buena calidad (3BB o mejores) de día 5 vs. día 6, en las pacientes de 35-38 años los resultados fueron comparables ($n = 124$, $TI = 39\%$ vs. $n = 62$, $TI = 35\%$, $p = 0.71$), al igual que en las pacientes menores de 35 años y receptoras ($n = 217$, $TI = 43\%$ vs. $n = 83$, $TI = 45\%$, $p = 0.85$).

La Tabla 2 muestra la distribución de los 645 blastocistos transferidos y de los 231 implantados, en las categorías de morfología definidas.

Tabla 1. Porcentaje de blastocistos de buena calidad y tasa de implantación según la calidad, en transferencias diferidas de blastocisto único, en dos grupos etarios.

	Ovo propios 35-38 años		Ovo propios menores de 35 años o receptoras		p
	Tr	%	Tr	%	
% blastocistos de buena calidad (3BB o mejor)		68%		81%	$p = 0,0002$
% Implantación blastocito 3BB o mejor	186	38%	300	43%	NS
Otros (calidad < 3BB)	88	18%	71	21%	NS

Tabla 2. Distribución de los blastocistos transferidos e implantados en las 22 categorías de clasificación morfológica.

	Blastocistos Transferidos	Blastocistos Implantados	%
1XX	16	2	13%
2xx	22	5	23%
3CC/XX	12	0	0%
3BC/CB	27	7	26%
3BB	76	23	30%
3AB/BA	25	10	40%
3AA	12	5	42%
4CC /XX	14	0	0%
4BC/CB	58	16	28%
4BB	71	24	34%
4AB/BA	87	30	34%
4AA	124	59	48%
5CC	2	0	0%
5BC/CB	5	1	20%
5BB	30	12	40%
5AB/BA	23	10	43%
5AA	33	23	70%
6CC	0	0	
6BC/CB	3	0	0%
6BB	2	1	50%
6AB/BA	0	0	
6AA	3	3	100%
Total	645	231	36%

Al ordenar esta población según valores ascendentes de tasa de implantación, se ve una relación positiva lineal en las tasas de implantación y la calidad y expansión de los blastocistos de días 5 y 6. A medida que la calidad del blastocisto aumenta, las tasas de implantación también lo hacen. No hemos sacado de estas gráficas las categorías con n bajos (Figura 1). La contribución de expansión y calidad de MCI y TE por separado se observan con más claridad en la Figura 2.

Por último, al analizar por separado las tasas de implantación de blastocistos de días 5 y 6, se observan resultados gráficos comparables de acuerdo con la calidad morfológica (Figura 3).

Discusión

La transferencia embrionaria en estadio de blastocisto tiene numerosas ventajas: mejora la evaluación de viabilidad (a través de la selección natural ocurrida en cultivo al comenzar a transcribir el genoma embrionario), mejora la tasa de embarazo

por transferencia (ya que es mejor la sincronización entre el metabolismo del embrión en día 5 y el ambiente uterino), disminuye la tasa de embarazos múltiples y los problemas maternos y neonatales asociados (al permitir una mejor selección de un único embrión para transferir), acorta el tiempo de tratamiento al realizarse menor número de transferencias por paciente, entre otras.

En este marco, identificar el embrión con el mejor pronóstico y el mayor potencial de implantación es clave, con el objetivo de maximizar las tasas de éxito.²⁰

La elección de un blastocisto de mejor calidad para transferir es un desafío individual y de equipo. Es importante lograr una estandarización del modo de clasificar y lograr la concordancia entre todo el equipo con un objetivo: la clasificación en el laboratorio debe predecir los resultados.

En este trabajo, realizado durante la puesta a punto de un programa de cultivo a blastocisto en nuestro centro, intentamos validar el criterio de evaluación de blastocistos utilizado, aplicado por cuatro personas.

Figura 1. Tasa de implantación de acuerdo con la calidad de blastocistos.

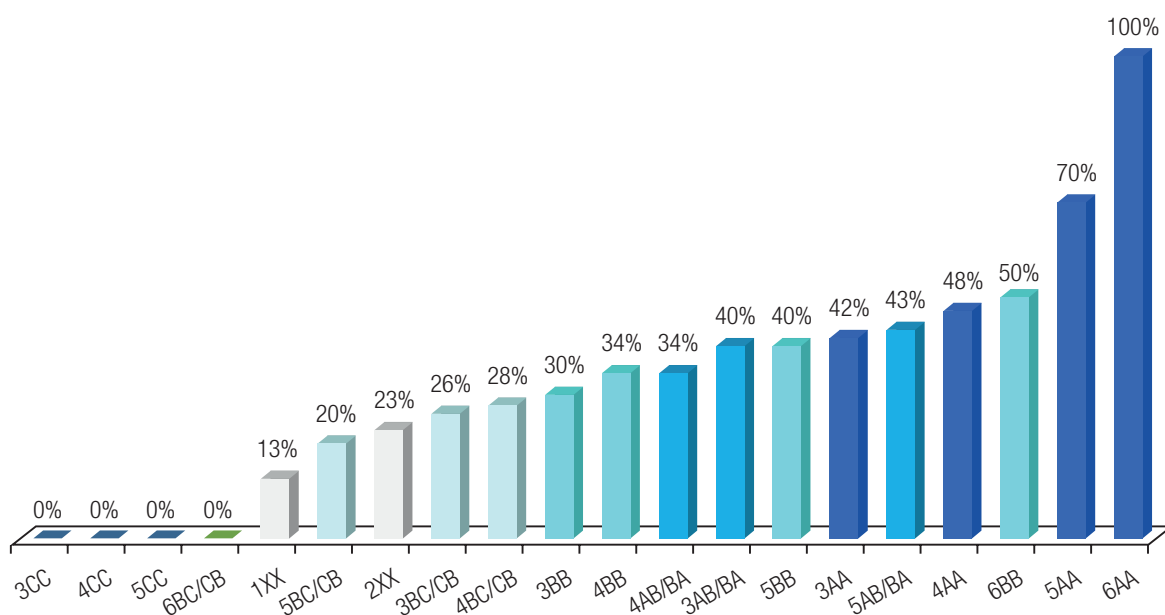


Figura 2. Tasa de implantación para cada grado de expansión y calidad de MCI-TE.

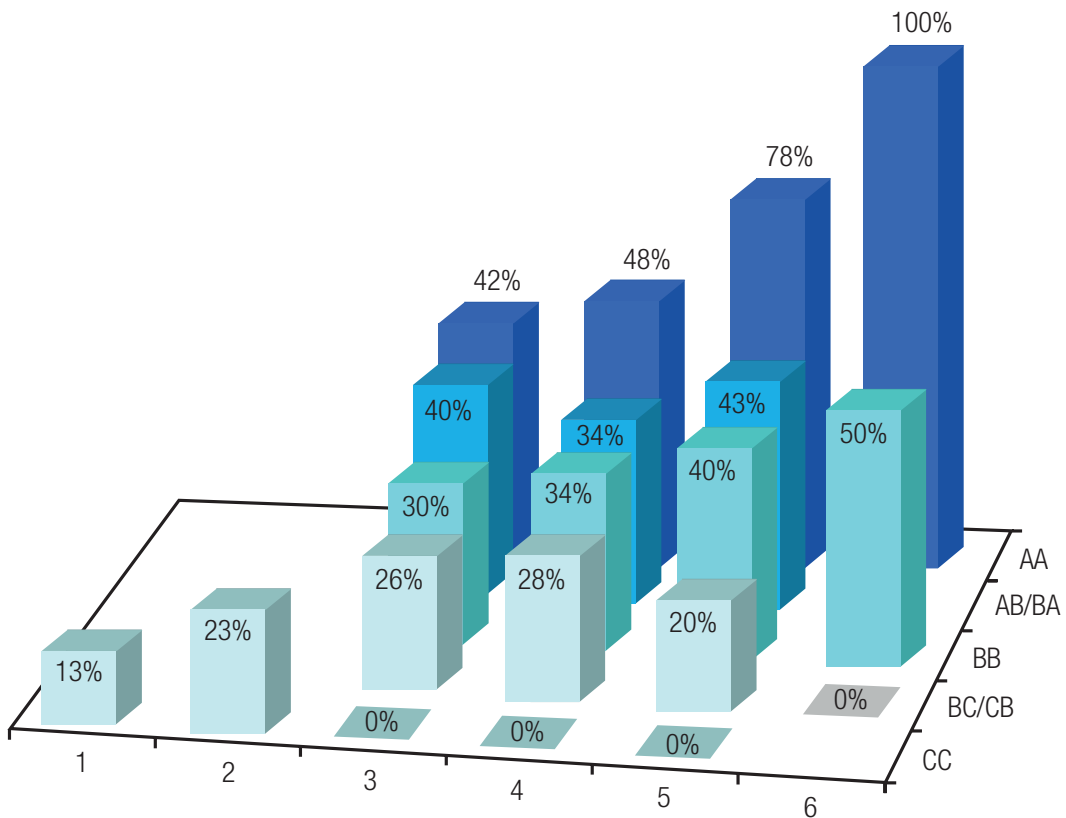
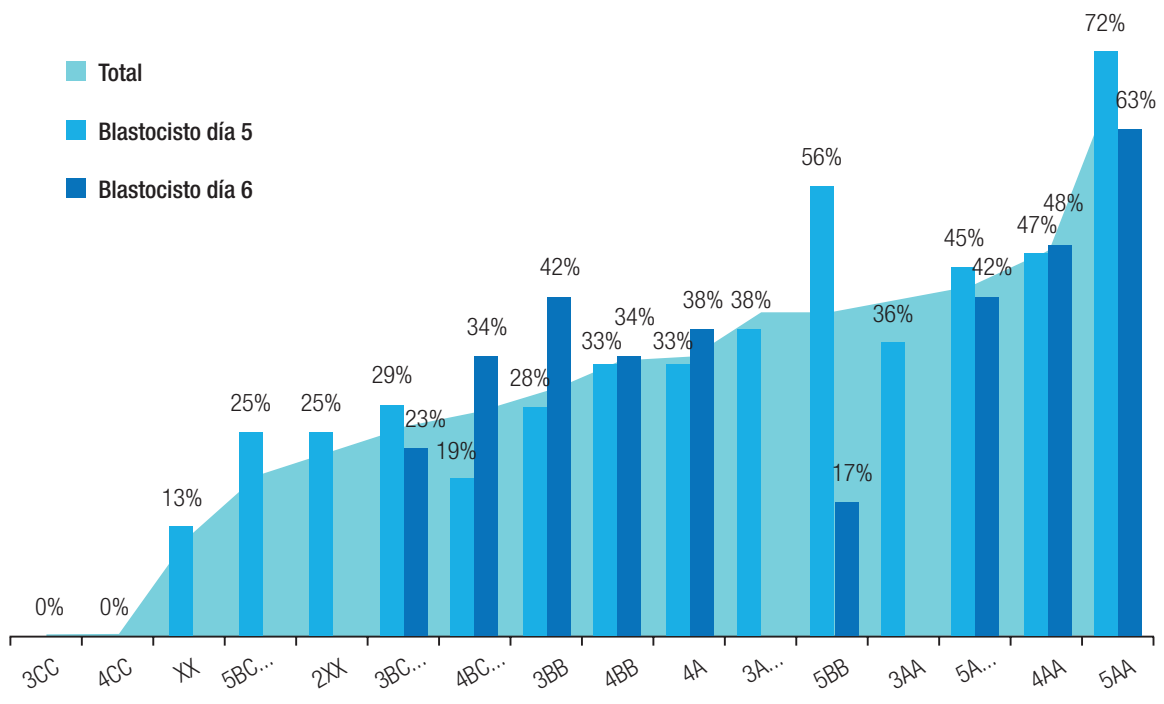


Figura 3. Tasa de implantación vs. calidad de blastocistos de día 5 vs. día 6.



En cuanto a la concordancia entre operadores, esta fue de 99%, 83% y 87% en la evaluación de expansión, MCI y TE respectivamente. Al combinarlos, la concordancia en la evaluación total de blastocistos fue de 69%. El test de concordancia permitió analizar puntos débiles de la descripción de Gardner,⁴ por ejemplo: describir el número de células de un MCI como “numerosas células” o “pocas células” no nos deja claro cuánto es numeroso o poco, y justamente estos eran puntos de diferencia entre las biólogas de nuestro centro. Por esto, se agregaron los tamaños propuestos por ASE-BIR¹⁰ de: un diámetro entre 1900 y 3800 μm^2 para MCI tipo A y B (diámetros comparables al tamaño de una blastómera estadio de 8 células y de 4 células, respectivamente), y un diámetro menor a 1900 μm^2 para MCI tipo C. Estos detalles o aclaraciones sobre la clasificación original permiten mejorar la concordancia en la evaluación. Por otro lado, la experiencia de realizar este test en equipo permite un reentrenamiento individual y una mejor concordancia en el grupo.

Sobre la población de este trabajo, mientras que el criterio original de Gardner⁴ ha sido publicado para evaluar blastocistos frescos en día 5, nuestra primera población del programa de blastocistos que aquí evaluamos consiste en transferencias de blastocistos únicos criopreservados en día 5 o 6 de desarrollo, tomando en cuenta la clasificación al momento de la transferencia. Es importante rescatar que, si bien el diseño de trabajo es diferente del Gardner,⁴ y la viabilidad de los embriones podría estar afectada por más factores que su morfología, desde un punto de vista clínico el laboratorio debe poder diagnosticar la viabilidad de un embrión luego de su descongelación.

El trabajo es preliminar por su N bajo. No obstante, tiene entre sus ventajas la identificación segura del embrión que logró la implantación, ya que se trata de transferencias de embrión único. En cuanto a la composición de la población, se incluyeron juntas pacientes de hasta 38 años y receptoras de ovocitos (de donantes menores de 35 años). La comparación entre ovocitos de igual edad, de receptoras vs. pacientes menores de 35 años, no mostró diferencias (resultados no publicados). La comparación entre ovocitos de mujeres menores de 35

años (pacientes y donantes) y los de mujeres de 35 a 38 años, mostró una diferencia en la proporción de blastocistos de buena calidad disponibles para transferir, mientras que hubo resultados comparables de implantación cuando se transferían blastocistos de buena calidad. El uso de espermatozoides de biopsia testicular no afectó los resultados (no publicados), por lo que no se excluyó a este grupo de pacientes.

Para analizar el valor predictivo del criterio de clasificación calculamos la tasa de implantación de cada categoría de calidad de blastocistos y simplemente las graficamos en orden ascendente. Si bien el n de algunos grupos es bajo (ya que estamos dividiendo 645 transferencias en 22 categorías), el orden en que quedan dispuestas las morfologías indica, de acuerdo con lo clasificado en el laboratorio, el orden de las categorías de peor a mejor viabilidad (metodología tomada de Parera Deniz y col.⁷).

El resultado no sorprende, ya que se espera que sean más viables los blastocistos expandidos, y con mejor calidad de TE y MCI. El propósito del trabajo es verificar que luego de aplicar el criterio, aquello que “evaluamos” como mejor, es lo que más implanta.

Nuestra población no es suficientemente numerosa para analizar si esta implantación depende más de la calidad de MCI o de TE, ya que necesitaríamos contar con suficientes blastocistos de TE comparable y diferente MCI, y blastocistos de MCI comparable y diferente TE.

Respecto del día de desarrollo del blastocisto, en nuestra población, este desarrollo diferente no tuvo impacto en la tasa de implantación de los buenos blastocistos de acuerdo con el grupo etario. Además, al analizarlos por grado calidad, separando día 5 de día 6, las gráficas no muestran diferencias en la implantación en uno u otro día. Este resultado es controvertido, ya que si bien algunos autores han publicado que la transferencia diferida de blastocistos de día 6 rescata su desfase con el endometrio,²¹ otros autores han encontrado que blastocistos euploides de calidad comparable tienen mejor implantación si blastularon en día 5.²²

Para concluir, este trabajo nos ha permitido validar el uso de esta clasificación para evaluar la viabilidad de blastocistos descongelados de días 5

y 6, mostrando correlación entre la evaluación de operadores y una relación esperada entre la calidad evaluada y la implantación.

Referencias

- Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3: 367-382.
- Quinn P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2004; 81: 27-29.
- Swain JE. Optimal human embryo culture. *Semin Reprod Med* 2015; 33: 103-117.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73: 1155-1158.
- Gardner DK, Schoolcraft WB. Elimination of high orders multiple gestations by blastocyst culture and transfer. In: Shoham Z, Howles C, Jacobs H, eds. *Female infertility therapy: current practice*. London: Martin Dunitz 1998: 267-274.
- Milki AA, Fisch JD, Behr B. Two-blastocyst transfer has similar pregnancy rates and a decreased multiple gestation rate compared with three-blastocyst transfer. *Fertil Steril* 1999; 72: 225-228.
- Parera Deniz F, Encinas C, La Fuente J. Morphological embryo selection: an elective single embryo transfer proposal. *J Assist Reprod* 2018; 22 (1): 20-25.
- Rehman KS, Bukulmez O, Langley M y col. Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertil Steril* 2007; 87: 1041-1052.
- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011; 26: 1270-1283.
- Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Ovocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos*. 2015; 3ra edición.
- Shapiro BS, Harris DC, Richter KS. Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertil Steril* 2000; 73: 582-586.
- Gardner DK, Stevens J, Sheehan CB et al. Analysis of blastocyst morphology. In: Elder KC, J. (ed). *Human Preimplantation Embryo Selection*. London: Informa Healthcare 2007; 79-87.
- Gardner DK, Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Mol Hum Reprod* 2016; 22 (10): 704-718.
- Zaninovic N, Berrios R, Clarke, RN y col. Blastocyst expansion, inner cell mass (ICM) formation, and trophectoderm (TM) quality: is one more important for implantation? *Fertil Steril* 2001; 76: S8.
- Ahlstrom A, Westin C, Reisman E et al. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting pregnancy and birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2011; 26: 3289-3296.
- Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ et al. Trophectoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertil Steril* 2013; 99: 1283-1289.
- Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST et al. Quantitative grading of a human blastocyst; optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril* 2001; 76: 1157-1167.
- Balaban B, Urman B, Sertac A et al. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2000; 74: 282-287.
- Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67: 73-80.
- Figueira R, Setti A, Braga D y col. Blastocyst morphology holds clues concerning the chromosomal status of the embryo. *Fertil Steril* 2015; 9: 215-220.
- Murata Y, Oku H, Morimoto Y et al. Freeze-thaw programmes rescue the implantation of day 6 blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2005; 11 (4): 428-433.
- Irani M, O'Neill C, Palermo GD et al. Blastocyst development rate influences implantation and live birth rates of similarly graded euploid blastocysts. *Fertil Steril* 2018, in press.