

***TRABAJO DE FIN DE MÁSTER***  
***En***  
***Biología y Tecnología Aplicada a la***  
***Reproducción Humana Asistida***

***Transferencia de embriones en día 7,***  
***¿una alternativa viable?***

Autor: Laura Jiménez Moreno  
Tutor: Cristina González Ravina

Alcobendas, Septiembre 2023

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
<b>Objetivos</b> .....	6
<b>Metodología</b> .....	6
<b>Resultados</b> .....	7
<b>Evolución de los medios de cultivo</b> .....	7
<b>Necesidades nutricionales de un blastocisto</b> .....	9
<b>Pérdida de embriones</b> .....	11
<b>Resultados reproductivos del día 7</b> .....	12
<b>Comparación con días 5 y 6</b> .....	13
<b>Causas</b> .....	14
<b>Aneuploidías</b> .....	14
<b>Sincronía endometrial</b> .....	16
<b>Edad</b> .....	17
<b>Asociación entre calidad embrionaria e implantación</b> .....	18
<b>Discusión</b> .....	20
<b>Conclusiones</b> .....	21
<b>Bibliografía</b> .....	23

## Resumen

La transferencia de embriones es una de las técnicas que forman parte de la rutina de un laboratorio de fecundación in vitro (FIV), pues se trata del paso final en un ciclo de reproducción asistida.

La transferencia de embriones se ha realizado históricamente cuando el desarrollo del embrión se encontraba en día 3, es más, muchos centros de reproducción asistida siguen realizando la transferencia en este estado embrionario de 8 células, sin embargo, los avances tecnológicos y el mayor conocimiento biológico en estos últimos años han mejorado los laboratorios de FIV, permitiendo la transferencia de los embriones durante el día 5 o 6 de desarrollo, cuando ya han alcanzado el estado de blastocisto. Este aumento del tiempo de incubación de los embriones en el laboratorio ha permitido una mejor selección de los mismos, incrementando así la calidad, el potencial de implantación y, por tanto, el éxito del tratamiento.

Más recientemente, en algunos laboratorios se está empezando a poner en práctica la transferencia del embrión en el día 7, pues esta puede suponer un aumento de las posibilidades de evaluación y selección, incrementando así las posibilidades reproductivas de algunas pacientes.

Los resultados de los primeros estudios realizados no arrojaban mucha esperanza de éxito para estos casos pues reflejaban una clara disminución de los resultados reproductivos, sin embargo, esta disminución se ha asociado a la asincronía endometrial presente en los ciclos que se incluyeron en los estudios, entre otras cosas. El uso de la vitrificación y la posterior transferencia del embrión permite una mayor sincronía entre endometrio y embrión arrojando ahora resultados mucho más esperanzadores. La cuestión que queda por resolver es si la calidad embrionaria se reduce con el aumento de la duración del cultivo embrionario y en qué medida esto repercute en los resultados. También persiste la incertidumbre sobre si el cese rutinario del cultivo en el día 6 da lugar a la eliminación de embriones que tienen el potencial de producir un embarazo sano y las implicaciones éticas que esto conlleva.

### **Palabras clave:**

*Blastocisto, cultivo, día 7, implantación, calidad embrionaria.*

## **Abstract**

Embryo transfer is one of the techniques that form part of the routine in an IVF laboratory, as it is the final step in an assisted reproduction cycle.

Initially, embryo transfer was performed on day 3, when the embryos were at the 8-cell stage. However, with the passage of time and the improvement of technology and IVF laboratories, embryo transfer is currently performed on day 5 or 6 of development, when the embryos have already reached the blastocyst stage. This increase in the incubation time of the embryos in the laboratory has allowed a better selection of the embryos, thus increasing the quality, the implantation potential and, therefore, the success of the treatment.

Lately, some laboratories are starting to implement embryo transfer on day 7, as this may increase the possibilities of evaluation and selection, thus increasing the reproductive possibilities of some patients.

The results of the first studies carried out did not give much hope of success in these cases as they reflect a clear decrease in embryo quality, however, this decrease has been associated with the endometrial asynchrony present in the cycles included in the studies, among other things. The use of vitrification and subsequent embryo transfer allows for greater synchrony between the endometrium and embryo and now yields much more encouraging results. The question that remains to be answered is whether embryo quality is reduced with increased duration of embryo culture and to what extent this has an impact on the results. Uncertainty also remains as to whether routine cessation of culture at day 6 results in the elimination of embryos that have the potential to produce a healthy pregnancy and the ethical implications of this.

### **Key words:**

*Blastocyst, culture, day 7, implantation, embryo quality.*

## Introducción

El inicio de la transferencia de embriones se remonta a 1891 cuando Walter Heape consiguió exitosamente transferir embriones de un conejo a otro. Este descubrimiento llevó al inicio de la experimentación y el estudio de la transferencia de embriones en estos pequeños mamíferos <sup>(1)</sup>, lo cual sería el punto de partida para la investigación de la embriología que acabaría dando lugar más adelante al logro de grandes avances en el campo humano. Es destacable el trabajo que realizó el obstetra y ginecólogo norteamericano John Rocks, que llevó a cabo experimentos de FIV y desarrollo embrionario con ovocitos humanos publicando los resultados de sus estudios en 1944 <sup>(2)</sup> en los que consiguió llevar a cabo por primera vez la fecundación de un óvulo fuera del útero de una mujer.

Una vez que se demostró que la fecundación in-vitro era posible, comenzó el estudio del medio de cultivo adecuado para el desarrollo de estos embriones y gracias a las observaciones de Whitten y Biggers se diseñó el medio de cultivo que, con algunas modificaciones, se utiliza actualmente. <sup>(1)</sup>

En 1978 se produjo el nacimiento de la “primera niña probeta”, conocida como Louise Brown. Cabe destacar, que en este caso no se recurrió a la estimulación hormonal para producir un mayor número de folículos, sino que se llevó a cabo con un ciclo natural, pues se sabía que las hormonas utilizadas en la estimulación daban problemas para que se produjese la implantación del embrión en el útero materno.

Todos estos avances y muchos más son los que nos han llevado hasta el día de hoy, donde se estima que unos 4 millones de bebés en el mundo han nacido gracias a las técnicas de reproducción asistida.

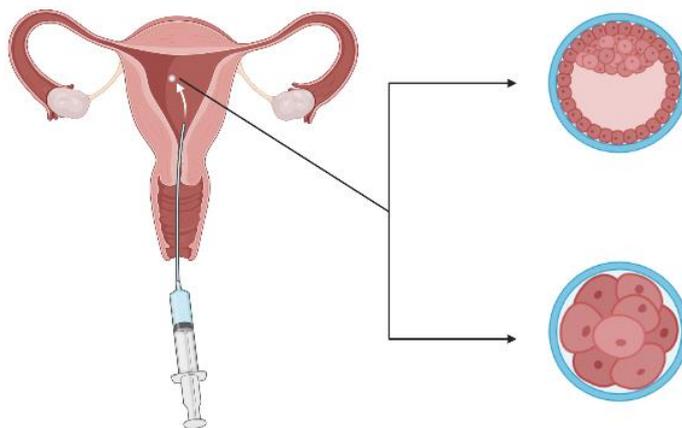
Hasta aproximadamente el año 1990, la transferencia de embriones se realizaba comúnmente en el día 3 del desarrollo embrionario. Sin embargo, se observó que al prolongar el cultivo in vitro y realizar la transferencia en el estado de blastocisto, se obtenían ciertas ventajas. En un trabajo de revisión realizado por *Glujovsky, D. et al.* <sup>(3)</sup>, se compararon numerosos estudios que evaluaban la transferencia de embriones en los días 3 y 5. Entre los criterios considerados para la comparación de ambos grupos, se observó un aumento en la tasa de implantación (12%), así como en los índices de embarazo clínico y recién nacido vivo en el grupo de embriones en el día 5.

Cabe destacar que estos resultados fueron especialmente notables en los casos en los que se realizó la transferencia en fresco. Además, se evaluó la tasa de congelación de embriones supernumerarios y se observó una clara disminución de dicha tasa en el grupo de blastocistos transferidos en fresco.

Existe otro estudio <sup>(4)</sup>, que al contrario de lo que sugiere el anterior, no observa una mejora estadísticamente significativa en las tasas de embarazo al comparar los dos grupos; sin embargo, esta tasa aumenta cuando la calidad de los embriones se clasifica como buena. De esta forma, alargar el cultivo de estos hasta estado de blastocisto podría ayudar a realizar una mejor selección del embrión a transferir.

Es importante destacar que la transferencia de embriones en estado de blastocisto presenta una tasa de supervivencia tras la vitrificación mayor que en el caso de los embriones en fase de división. Esta mayor tasa de supervivencia es especialmente relevante en los casos en los que se realiza una transferencia en diferido ya que reduce las posibilidades de que se produzca la pérdida de embriones tras la desvitrificación.

La transferencia en diferido tiene a su vez diferentes ventajas ya que permite una mejor planificación del ciclo y adaptación más precisa y personal al ciclo de la paciente. Además, tiene la ventaja adicional de evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) lo cual contribuye a mejorar la seguridad de los ciclos de reproducción asistida.



**Figura 1:** Morfología del blastocisto vs del embrión en D3

*Biorender.com*

Con el paso de los años la prolongación del cultivo embrionario hasta el estadio de blastocisto y los avances en las técnicas de criopreservación han mejorado la selección de embriones y la sincronización entre el endometrio y el embrión. Idealmente, los embriones humanos alcanzan el estadio de blastocisto después de 5 días de cultivo, pero algunos tienen un desarrollo más lento. El momento de la blastulación y la duración necesaria para una expansión completa se consideran indicadores cinéticos de la calidad embrionaria.

Los primeros estudios que compararon los resultados reproductivos entre embriones de día 5 y embriones de día 6 no encontraron diferencias significativas. Sin embargo, investigaciones más recientes han demostrado una disminución significativa en las tasas de embarazo clínico y recién nacidos vivos para los embriones de día 6. <sup>(5)</sup>

Con estos datos y a pesar de que los blastocistos de día 6 suelen ser criopreservados, existe una tendencia general a descartar los embriones que no alcanzan el estadio de blastocisto en los primeros 6 días de cultivo. Esto se basa en la suposición de que los blastocistos de día 7 tienen un pronóstico muy desfavorable. Sin embargo, esta práctica ha sido criticada recientemente debido al riesgo de descartar embriones viables. Diferentes estudios han demostrado que los embriones cultivados hasta el día 7 pueden tener una morfología superior, ser euploides y resultar en el nacimiento de un bebé sano después de la descongelación.

Además, la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva informó en 2018 que la criopreservación de blastocistos en el día 7 podría ser una opción viable a pesar de la falta de datos clínicos. Con el objetivo de ofrecer una visión general de la información disponible hasta ahora, este trabajo de fin de máster revisará los diferentes estudios sobre este tema.

## Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de fin de máster consiste en la realización de una revisión bibliográfica actual del procedimiento de transferencia de embriones en día 7 exponiendo las indicaciones, las tasas de éxito reproductivo y las posibles causas que alteran las tasas reproductivas. También se plantearán las diferentes ventajas y desventajas en comparación con la transferencia de embriones en días anteriores.

## Metodología

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica que ha permitido la recopilación de información previamente contrastada.

Para dicha búsqueda, se han utilizado fuentes de datos biomédicas internacionales (PubMed, Human Reproduction, Human Reproduction Update, RBM Online, Fertility and Sterility y Web of Science), al igual que se ha hecho uso de la herramienta *Google Scholar*. Durante la búsqueda se ha hecho uso de términos y descriptores como “*embryo transfer, day 7, indications, therapeutic uses, blastocysts, implantation, blastulation*” así como el operador AND. Aparte, se han tenido en cuenta los siguientes criterios:

-Se ha limitado la búsqueda en artículos publicados en el intervalo de 2010-2023 para centrar la misma a los estudios más recientes. En algunos casos, se han aceptado artículos datados anteriormente debido a la relevancia de estos.

-Se ha priorizado el uso de artículos que incluyeran las palabras clave en el título.

Además, las imágenes y tablas incluidas en este trabajo han sido de elaboración propia a través de las herramientas BioRender (*biorender.com*) y Excel, se incluyen también imágenes externas de otros artículos con su correspondiente referencia bibliográfica.

## Resultados

### Evolución de los medios de cultivo

En los últimos años, se ha implementado en diversos laboratorios la práctica de cultivar embriones de manera prolongada hasta el día 7. En los primeros estudios realizados al respecto <sup>(6)</sup>, se reportaron tasas de embarazo clínico relativamente bajas en comparación con los días de cultivo anteriores. Aun así, estos estudios también destacaban el potencial clínico relevante de la transferencia de embriones en esta etapa tardía y han planteado la posibilidad de que la práctica de descartar embriones que no alcancen el estado de blastocisto en el día 6 pueda estar excluyendo embriones con capacidad de desarrollo viable.

La posibilidad de llevar a cabo el cultivo hasta D7, no hubiera existido de no ser por la mejora de los laboratorios de FIV haciendo especial énfasis en los medios de cultivo que sostienen dicho desarrollo.

En sus inicios, los medios de cultivo consistían en una simple solución salina compuesta principalmente por cloruro sódico, potásico y magnésico y bajas concentraciones de bicarbonato sódico. Unos años más tarde se le añadía a esta solución una fuente de energía como lo es la glucosa y posteriormente, se modificaba la concentración de bicarbonato sódico para alcanzar los niveles fisiológicos de CO<sub>2</sub> deseados. Todos estos avances iniciales ni siquiera estaban pensados para sostener el cultivo de embriones, sino que fueron sintetizados para la observación y estudio de diferentes tipos celulares.

Por aquel entonces, en sus inicios, el cultivo embrionario se realizaba junto con células de las trompas de Falopio y, de hecho, fueron capaces de llegar a desarrollar un embrión hasta el estado de blastocisto en ratones <sup>(7)</sup> en una solución de bicarbonato de KrebsRingers modificada que contenía lactato sódico, piruvato sódico, glucosa, suero bovino, estreptomycin y penicilina.

En aquellos momentos, el bloqueo embrionario era uno de los mayores problemas en la reproducción asistida, sobre todo para los embriones de ganado que debían ser transferidos en estados más avanzados, a diferencia de los embriones humanos que podían ser transferidos en un estado temprano.

La FIV y el cultivo de embriones humanos fue propuesto por Rock y Menkin en 1944, los óvulos se obtuvieron mediante laparoscopia y maduraron y fecundaron *in-vitro* en un medio que contenía solución de Tyrode, BSA y penicilina junto con piruvato sódico, rojo de fenol y una mayor concentración de bicarbonato. También se consiguió cultivar embriones humanos hasta la fase de blastocisto utilizando un medio con suero humano o de ternera fetal. Los embriones de los primeros ciclos de FIV se cultivaron en solución salina simple de Earle con piruvato suplementada con suero de la paciente, y así fue como se produjo el cultivo del primer bebé que nació gracias a las técnicas de reproducción asistida.

En aquel entonces existía una transparencia total en cuanto a la composición de los medios y así cada uno lo elaboraba para sí mismo, pero esto cambió cuando los grupos Ménézó y Quinn sentaron las bases para la comercialización de los medios de cultivo.

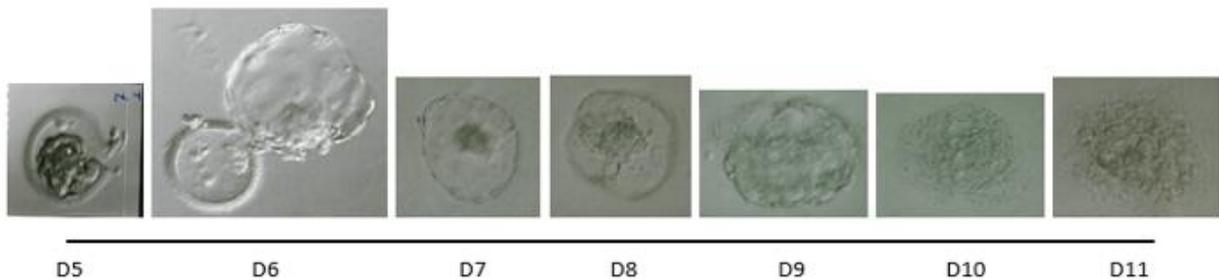
El cocultivo fue un capítulo importante en la historia del cultivo de embriones ya que inicialmente eran esenciales para conseguir el cultivo *in-vitro*, este se llevaba a cabo con fibroblastos fetales de útero bovino o células tubáricas humanas. Sin embargo, con el tiempo y debido a los riesgos y dificultades técnicas del mismo, el cocultivo fue desapareciendo mientras que a la vez se buscaba la fórmula ideal mediante dos caminos: Uno fue el “*back to nature*” que estudiaba los fluidos del aparato reproductivo y los imitaba en el medio de cultivo desarrollando así el fluido humano tubárico (HTF) que resultó tener muy pocas similitudes con el fluido tubárico real.

El otro camino consistía en la estrategia de optimización simplex utilizando programas informáticos para evaluar simultáneamente múltiples componentes y sus interacciones. Este enfoque consiguió identificar los componentes y la concentración que ofrecían la máxima respuesta, pero no los mejores resultados.

Posteriormente, cuando se concluyó que el entorno natural del embrión va cambiando durante su trayecto por el aparato reproductor se desarrollaron los medios secuenciales, los cuales poseen distintos componentes en función del día de desarrollo del embrión. Al tomar líquido uterino y tubárico en las diferentes fases del ciclo menstrual se demostró el cambio cíclico que sufren las concentraciones de glucosa y lactato, dando origen a los medios G1 y G2. En este momento también se empezaron a tener en cuenta diferentes aspectos como la importancia de los aminoácidos esenciales y no esenciales junto con las vitaminas para el desarrollo hasta blastocisto. <sup>(8)</sup>

Se observó también, que los aminoácidos se desaminan en solución y pueden llegar a ser tóxicos debido a la formación de amoníaco por ello los medios de cultivo que los contengan solo se pueden incubar entre 2 y 3 días.

Todos estos avances han permitido que el desarrollo hasta blastocisto sea posible e incluso alcance unas tasas mayores que en estado de división. En un estudio reciente <sup>(9)</sup> que examina el desarrollo del embrión hasta el día 14, que es el límite legal que se puede alcanzar, se concluye que es necesaria la optimización de cultivos para permitir un desarrollo más extenso de los embriones ya que este acaba perdiendo su estructura incluso días antes cuando se cultiva hasta D14. <sup>(Figura 2)</sup> Un cultivo más prolongado es necesario para poder conocer los mecanismos de desarrollo del embrión humano ya que entre los días 14 y 28 se considera un periodo de “*caja negra*” y se desconoce qué es lo que sucede. Conocer cómo se produce ese desarrollo y las condiciones fisiológicas que se dan para que este tenga lugar podrían ayudarnos a recrear en mejor medida esas necesidades energéticas y nutricionales de los embriones dentro de un medio de cultivo.



**Figura 2:** Desarrollo del embrión de D5-D11.

Imágenes cedidas por Ortega-Jaén D.

### **Necesidades nutricionales de un blastocisto**

En primer lugar, a la hora de seleccionar un medio de cultivo es importante tener en cuenta que las condiciones del laboratorio, así como numerosos factores más, influirán en el estado del mismo, por lo que lo ideal es que cada laboratorio pruebe y seleccione cuál es el medio de cultivo que mejor se adapta a sus necesidades.

- Agua, supone el principal componente del medio de cultivo. Será importante tener en cuenta su pureza.
- Carbohidratos como el piruvato, el lactato y la glucosa. Estos se encontrarán en diferentes concentraciones dependiendo del estado de desarrollo del embrión. En los primeros pasos y hasta el estado de 6-8 células el entorno del embrión se encuentra enriquecido con lactato y piruvato, con bajas concentraciones de glucosa. Después de la activación genómica, que se produce en este estado de 6-8 células, se inicia el consumo de glucosa.

En la actualidad, se ha establecido que una concentración de glucosa de 2,78 mM en el medio de cultivo es adecuada para mantener la motilidad del espermatozoides, satisfacer sus necesidades y evitar posibles efectos tóxicos durante las primeras divisiones embrionarias. Además, la presencia de glucosa es esencial para que se produzca el proceso de eclosión (*hatching*) del blastocisto.

Cuando el embrión entra en la etapa glucolítica, se recomienda mantener una concentración de fosfato alrededor de 0,25 mM. Esto se hace con el objetivo de minimizar los posibles efectos negativos que el fosfato podría tener cuando se combina con la glucosa.

- Aminoácidos que son la base de numerosos procesos celulares. Es prácticamente imposible determinar qué aminoácidos y en que concentraciones resultarían óptimas para el desarrollo del embrión. Diferentes estudios han identificado la glicina, la taurina y la glutamina como aminoácidos importantes. <sup>(10)</sup>
- Proteínas, que suponen un suplemento de macromoléculas que resultan útiles para la estabilización de membranas, como moléculas portadoras de otros elementos o como fuente de nitrógeno, entre otras cosas.
- pH, que puede variar mucho entre diferentes laboratorios, está principalmente determinado por la concentración de bicarbonato en el medio y la concentración de CO<sub>2</sub> en el incubador, debe encontrarse entre 7,3 y 7,4.
- Aceite, para prevenir la evaporación del medio de cultivo, lo cual cambiaría las condiciones del mismo si se produjese.
- Se recomienda, por último, la inclusión de antibióticos.

## Pérdida de embriones

El resultado exitoso de un ciclo de reproducción asistida depende en gran medida del número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto y de la calidad de estos. No obstante, durante todo el proceso que conlleva llegar hasta la etapa de transferencia, se producen pérdidas de embriones, lo que a su vez disminuye la eficacia global del procedimiento. A continuación, repasaremos en qué procesos se produce esta pérdida:

1. El rendimiento de recuperación de ovocitos se refiere a la proporción de ovocitos recuperados con éxito en relación con el número total de folículos aspirados durante la punción. En general, se espera un rendimiento de recuperación de ovocitos de alrededor del 70-80%. Sin embargo, es importante tener en cuenta que este porcentaje puede variar en cada caso y dependerá de varios factores, como la respuesta ovárica de la paciente y la habilidad del equipo médico.
2. La tasa de éxito de la fecundación mediante ICSI varía dependiendo de varios factores, como la calidad del ovocito y del espermatozoide, la experiencia del equipo médico y las condiciones específicas de cada ciclo de tratamiento. Sin embargo, por lo general, las tasas de fecundación exitosa mediante ICSI son muy altas pues se estima que oscilan entre el 70% y el 80%.
3. Por último, nos encontramos con el proceso de selección embrionaria que da lugar al descarte de un gran porcentaje de los embriones y puede cambiar según varios factores, como las políticas y prácticas del centro de reproducción asistida, así como los criterios de selección utilizados.

En general, durante la selección embrionaria se descartan aquellos embriones que no cumplen con los criterios establecidos para la transferencia o la criopreservación, de hecho, el descarte de embriones por desarrollo lento durante la selección embrionaria es una práctica común en los tratamientos de reproducción asistida. Cuando los embriones presentan un desarrollo más lento en comparación con otros se suele tomar la decisión de descartarlos para la transferencia o la criopreservación. Sin embargo, alargando el límite de tiempo de desarrollo embrionario hasta blastocisto, este porcentaje disminuiría.

## Resultados reproductivos del día 7

Se han llevado a cabo diversos estudios que han mostrado tasas clínicas más altas en comparación con estudios anteriores. De hecho, algunos autores han explicado este fenómeno como resultado de los avances y la extensión en la aplicación de la técnica de vitrificación <sup>(6)</sup>. Los resultados de estos estudios se presentan en la **Tabla 1**.

<i>Artículo</i>	<i>n</i>	Tasa de embarazo (%)	Tasa de implantación (%)	Tasa euploidía (%)	Nacidos vivos (%)
<i>Kovalevsky et al.</i> <sup>(6)</sup> (2013)	794 ciclos	33,3	31,3	N/A	N/A
<i>Du et al.</i> <sup>(14)</sup> (2018)	2908 mujeres	32,5	24,3	N/A	25,2
<i>Whitney et al.</i> <sup>(17)</sup> (2019)	1925 blastocistos	N/A	56,3	35,9	43,8
<i>Huang et al.</i> <sup>(13)</sup> (2020)	4489 mujeres	32,9	N/A	N/A	26,6
<i>Hernandez-Nieto et al.</i> <sup>(16)</sup> (2019)	25772 blastocistos	30,1	44,8	40,5	21,5

**Tabla 1:** Resultados reproductivos de D7 según diferentes estudios

En estos datos encontramos una media de 32,2% de tasa de embarazo siendo además los resultados bastante homogéneos entre ellos; esto no ocurre en el caso de la tasa de implantación y de nacidos vivos. En el primer caso la tasa varía desde un 24,3% a un 56,3% y en el caso de la tasa de recién nacidos vivos la oscilación se produce desde un 25,2% a un 43,8%. La variación de estos datos depende de numerosos factores como el perfil de las pacientes, la cantidad de datos recopilados, la propia variación existente entre clínicas diferentes, etc.

En el caso de la tasa de aneuploidías, los datos son escasos ya que sólo dos del total de los estudios presentan dicha información con una media del 38,2% de tasa de euploidía.

Al analizar estos porcentajes, se observa la variación existente entre los diferentes autores, aun así, se puede apreciar que las tasas de éxito reproductivo son aceptables, lo que sugiere que descartar embriones debido a un desarrollo más lento en el día 6 podría llevar a desechar embriones que son perfectamente viables.

El metaanálisis más reciente que recoge numerosos estudios <sup>(5)</sup> también indica una reducción en las tasas de implantación y embarazo clínico al comparar los resultados entre día 7 y los días anteriores, en este mismo estudio, también se plantea la posibilidad de que estos embriones tengan una tasa de supervivencia a la vitrificación menor en comparación con los días anteriores pero al analizar los resultados no se observan diferencias significativas cuando se comparan con la supervivencia de los blastocistos de día 5.

### Comparación con días 5 y 6

Para entender mejor los datos expuestos en la Tabla 1, es recomendable hacer una revisión de esos mismos datos en los días anteriores y realizar una comparación entre todos, dicha comparación se recoge en la **Tabla 2**.

<i>Hernández-Nieto et al. <sup>(16)</sup></i>				<i>Du et al. <sup>(14)</sup></i>			
	D5	D6	D7		D5	D6	D7
PR	65,4	56,2	30,1	PR	59,2	53,8	32,5
IR	77,9	69,6	44,8	IR	50,2	42,2	24,3
LB	56,4	45,8	21,5	LB	47,9	42,8	25,2
<i>Kovalevsky et al. <sup>(6)</sup></i>				<i>Hiraoka et al. <sup>(*)</sup></i>			
	D5	D6	D7		D5	D6	D7
IR	47,5	26,8	31,3	IR	42,3	41,5	42,9
PR	56,4	33,9	33,3	PR	53,5	53	52,6
<i>Whitney et al. <sup>(17)</sup></i>				<i>Huang et al. <sup>(13)</sup></i>			
	D5	D6	D7		D5	D6	D7
IR	79,3	68,5	56,3	LB	50,7	44,7	26,6
LB	77,2	67,4	43,8				

**Tabla 2:** Comparación de resultados reproductivos entre D5, D6 y D7.

PR = pregnancy rate (tasa de embarazo), IR = implantation rate (tasa de implantación), LB = live birth (nacidos vivos)

Aunque se trata de una escasa selección de artículos, la bibliografía general muestra una reducción de los resultados reproductivos cuando la transferencia se realiza en día 7 al compararlos con la transferencia de embriones en los días 5 y 6. Si analizamos los datos, la tasa de embarazo se reduce en un 28,4% de media entre el día 5 y el día 7. En cuanto a la tasa de implantación, la variación entre los días tiene una media de 24,6% de disminución de la misma en el día 7 con respecto al día 5. Por último, en cuanto a la tasa de recién nacido vivo, la disminución producida entre ambos días se encuentra en un 27,2% de media. Esto supone casi un cuarto menos de éxito reproductivo en comparación con los blastocistos que han alcanzado su desarrollo en el día 5. Aun así, la mayoría de los autores coinciden con el hecho de que, aunque se produzca una reducción de las tasas de éxito, estas siguen siendo suficientemente altas como para considerar el uso de estos embriones. (5, 11, 12, 13, 14)

Hay que tener en cuenta que, aunque estemos hablando de la viabilidad de los embriones de día 7 siempre se recomienda la transferencia de embriones con un desarrollo completado en días anteriores dejando estos para aquellos casos en los que no hay posibilidad de transferir blastocistos anteriores al día 7.

## **Causas**

### **Aneuploidías**

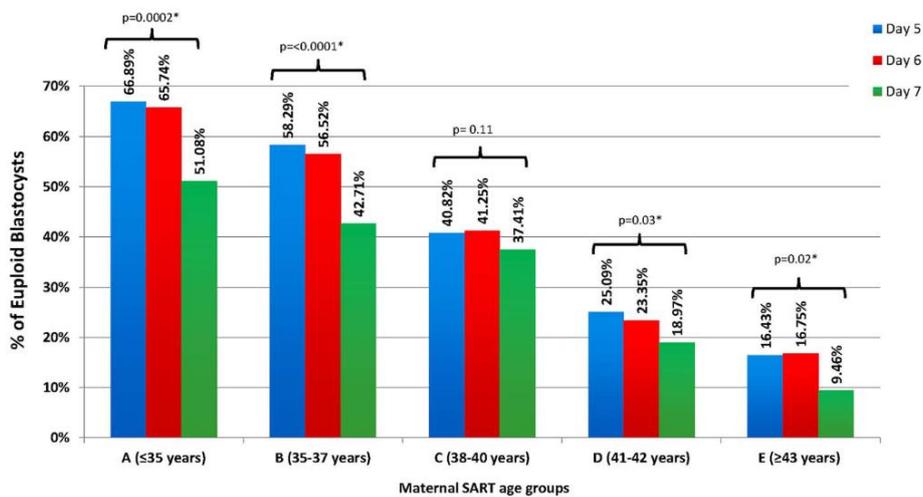
El tiempo medio que emplea un blastocisto hasta llegar al estado de blasto expandido se encuentra en torno a las 111-121h tras la inseminación, por lo que 168h (Día 7) se encuentra bastante alejado del tiempo medio. Ese retraso en el desarrollo podría deberse a un retraso de la primera división, las divisiones posteriores o a eventos anormales ocurridos durante la fase de división temprana. Estos eventos serían consecuencia de alteraciones genéticas de tipo mosaico las cuales, en algunos casos, pueden ser resueltas por parte de los mismos embriones, pero originaría igualmente estos patrones de desarrollo anormales. <sup>(11)</sup> Sin embargo, en otros casos nos encontramos con embriones que poseen una dotación genética aneuploide que podría ser la causa de la menor implantación que presentan los embriones de día 7.

En uno de los primeros estudios que se realizó al respecto <sup>(15)</sup> se encontró una tasa de 63,3% de blastocistos D7 que presentaban una dotación cromosómica alterada. Cuando en el mismo estudio se dividió a las pacientes en diferentes subgrupos de edad se concluyó que la tasa variaba en función de la edad de la paciente ya que las más jóvenes presentaban una tasa del 54,7% mientras que en las mayores de 40 años aumentaba hasta un 91,6%.

Recientemente, surgen nuevos estudios centrados en este tema y algunos exponen tasas de aneuploidía similares al anterior que oscilan entre 40,5-64,1% <sup>(16,17)</sup>.

Es interesante destacar un último estudio <sup>(16)</sup> que incluye a 4136 pacientes divididas en subgrupos según la edad y en las que observan que las tasas de aneuploidía dependen en mayor proporción de la edad de la paciente que del tiempo de desarrollo del blastocisto. (Figura 3) Por otro lado, dividen los blastocistos según calidad morfológica y en concordancia con estudios anteriores <sup>(15)</sup> observan que la morfología y el estado de ploidía tienen una correlación bastante débil.

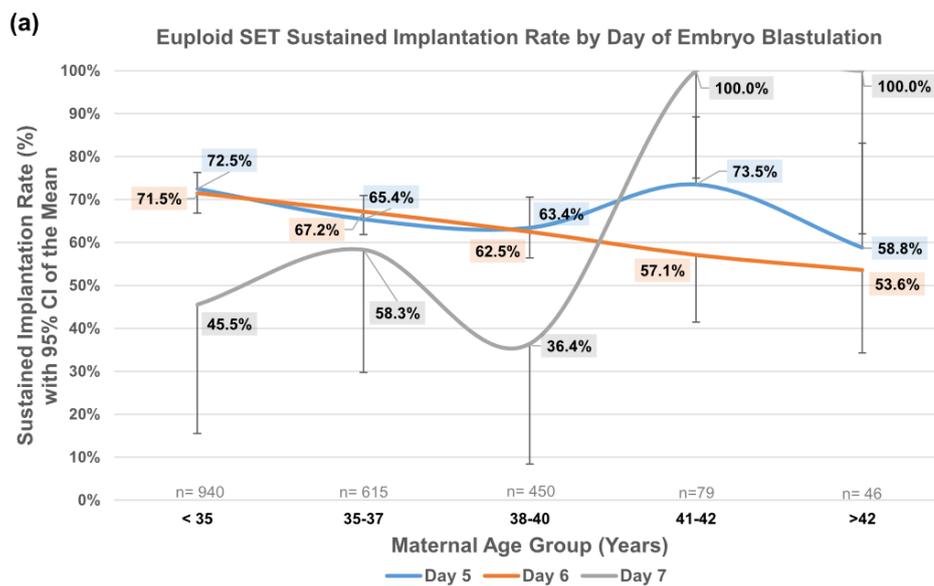
Sin embargo, la morfología si era importante a la hora de determinar la probabilidad de implantación ya que aquellos embriones clasificados de buena calidad tienen una tasa de implantación significativamente superior a aquellos clasificados de baja calidad.



**Figura 3:** Porcentaje de blastocistos euploides en función de la edad y el día de desarrollo. Hernández-Nieto et al. (2019) *Human Reproduction*, 34(9), 1697-1706.

Niu *et al.* <sup>(12)</sup> realizan un estudio que incluye pacientes con transferencia en D7 en el que sólo se usan ovocitos donados y al no observar diferencias significativas sugiere que las aneuploidías podrían ser la gran causa de la reducción del éxito reproductivo en lugar del día en el que se produce la transferencia.

Por otra parte, Tieggs *et al.* <sup>(18)</sup> demuestran que una vez que se obtiene un blastocisto euploide, la SIR (*sustanaible implantation rate*) es similar o, como mucho, se reduce ligeramente en comparación con los embriones de los días 5 y 6, pero sigue siendo muy aceptable.



**Figura 4:** Tasas de implantación sostenida (SIR) por día de blastulación embrionaria y estratificadas en los grupos de edad. Tieggs *et al.* (2019), *Human Reproduction*, 34(9), 1632-1639.

### Sincronía endometrial

Aparte de las aneuploidías, otro factor que podría afectar al éxito de la implantación es la sincronía de los embriones con el endometrio. Existen estudios que sugieren que el problema que presentan los embriones de desarrollo lento reside en la sincronía de estos con el endometrio de la paciente y esta puede verse afectada a su vez por los mismos protocolos de estimulación ovárica.

En condiciones normales *in-vivo*, los gametos se encuentran, se unen y se desplazan por las trompas de Falopio en forma de embrión en desarrollo hasta el día 5 o 6, que es cuando acceden a la cavidad endometrial para implantarse.

Si comparásemos los resultados reproductivos de embriones con distinto tiempo de desarrollo pero que tuvieran una sincronía endometrial acertada para cada caso las diferencias entre los embriones de distintos días no son tan significativas, o al menos eso fue lo que se observó en un estudio realizado en 2018. <sup>(18)</sup>

En el caso de los embriones de desarrollo lento, se encuentran con un tiempo limitado dentro de esa “ventana de implantación” y en muchos casos pueden encontrarse con un endometrio que no tiene el grosor y la vascularización necesaria. Para controlar este problema, se sugiere que los embriones de desarrollo lento sean transferidos en diferido para lograr unas mejores condiciones endometriales. <sup>(11)</sup>

## **Edad**

Un factor asociado al aumento en la tasa de aneuploidías es la edad de la paciente. Se ha observado que a medida que aumenta el tiempo de desarrollo del embrión hay un incremento en la edad media de las pacientes (34,9 para D5 vs 37,1 para D7) <sup>(19)</sup>. Esto implica que las mujeres mayores de 35 años tienen más probabilidades de obtener embriones de desarrollo lento debido a su mayor probabilidad de aneuploidías. Actualmente, se ha generalizado el uso del diagnóstico genético preimplantacional (PGT-A) en pacientes que presentan una edad superior a los 35 años. Son precisamente este perfil de pacientes las que suelen presentar una mayor necesidad de uso de embriones cultivados hasta día 7 que, como se ha mencionado anteriormente, presentan mayores tasas de aneuploidía. Mediante la realización de la técnica de PGT-A, podríamos seleccionar aquellos embriones euploides y beneficiar a estas pacientes con un número limitado de los mismos.

## **¿Puede afectar a la descendencia?**

Una de las inquietudes que surgen es la posibilidad de que la transferencia de embriones de desarrollo lento esté asociada con un mayor riesgo de malformaciones congénitas en

los recién nacidos. Esta preocupación ha sido abordada en estudios recientes, que han dirigido su atención específicamente hacia este aspecto.

Un primer estudio que evalúa el impacto del uso de blastocistos de día 7 y los resultados obstétricos y perinatales de recién nacidos demostró un mayor puntaje Z y mayor riesgo de VLGA (“*Very large for gestational age*”) en blastos de día 7 en comparación con los de día 3, lo cual puede generar preocupación a largo plazo por su asociación a diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares, pero al compararlos con los días anteriores no se encontraron diferencias significativas, de hecho, se encontró un riesgo menor de embarazo ectópico para blastocistos de día 7 en comparación con los de día 3. <sup>(6)</sup>

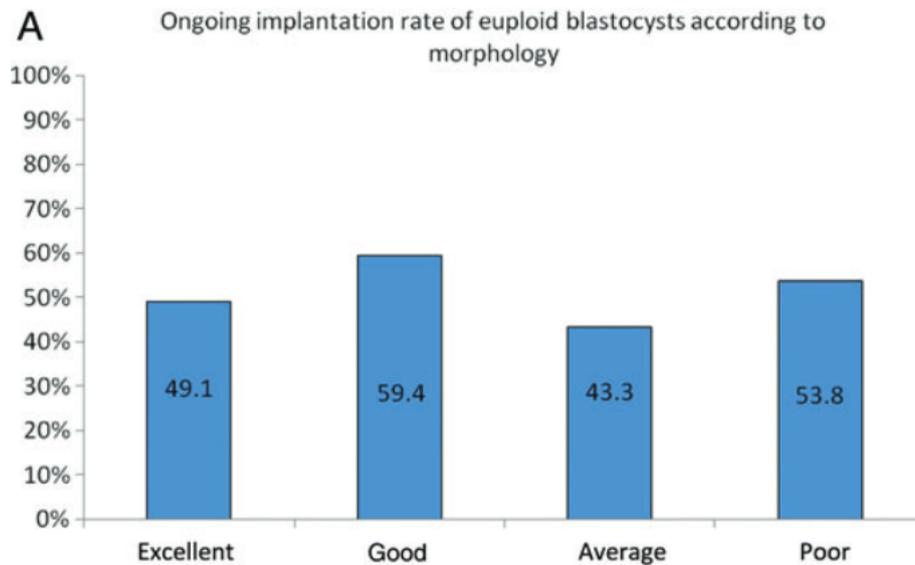
Estos resultados coinciden con estudios anteriores en los que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la tasa de malformaciones en recién nacidos vivos provenientes de un blastocisto de día 7 en comparación con aquellos de días anteriores, siendo aproximadamente de un 0,66% <sup>(14)</sup> Por este motivo, la seguridad de la descendencia no debería suponer un problema u obstáculo para la transferencia en día 7.

### **Asociación entre calidad embrionaria e implantación**

*Cimadomo et al.* <sup>(20)</sup> realizan un estudio utilizando la inteligencia artificial para analizar el desarrollo lento de los embriones y su calidad. En este estudio se ve que efectivamente los embriones de desarrollo lento son de peor calidad tanto a ojos de embriólogos expertos como de la inteligencia artificial y señalan el tiempo de expansión del blastocisto como un marcador clave de alta calidad.

No obstante, ¿es realmente la morfología del blastocisto un indicador de su calidad? Un análisis exhaustivo de una muestra considerable (956 blastocistos) reveló resultados sorprendentes. <sup>(21)</sup> Los embriones euploides, que presentaban una calidad morfológica inferior, mostraron tasas de implantación similares (53,8%) en comparación con los blastocistos evaluados como de excelente o buena calidad morfológica (49,1%). <sup>(Figura 5)</sup> Estos hallazgos también concuerdan con otro estudio <sup>(22)</sup> que demostró resultados clínicos excelentes cuando la selección se basaba en la composición cromosómica (CCS) en lugar de en la morfología. De este modo, la morfología parece no ser un parámetro relevante cuando se cuenta con varios embriones euploides para la transferencia.

No obstante, en el mismo análisis, se observó una mayor incidencia de aneuploidía entre los blastocistos con puntuaciones morfológicas pobres, y se detectó una probabilidad más alta de euploidía en los embriones con puntuaciones morfológicas favorables. Sin embargo, esta relación fue débil, ya que una proporción de embriones aneuploides eran capaces de alcanzar puntuaciones morfológicas excelentes.



**Figura 5:** Tasa de implantación en curso de 215 blastocistos euploides según la morfología y la tasa de desarrollo. Capalbo et al. (2014) *Human Reproduction*, 29(6), 1173-1181.

Atendiendo a estos datos, podemos deducir que la clásica puntuación morfológica que se le atribuye todavía hoy en día a los embriones puede estar más relacionada con la probabilidad de que el embrión sea euploide que con la probabilidad de implantación, lo cual concuerda con el caso de los embriones de desarrollo lento ya que quizás, la menor frecuencia con la que encontramos embriones de buena calidad se debe a la menor frecuencia de embriones euploides que podemos encontrar en D7.

## Discusión

Los datos presentados en este trabajo de fin de máster muestran una reducción de los resultados reproductivos cuando la transferencia se realiza en día 7 de desarrollo embrionario, generalmente asociada a blastocistos con un desarrollo lento. Son múltiples las causas relacionadas con esta disminución. Se ha observado que existe una mayor tasa de embriones aneuploides cuando su desarrollo hasta blastocisto se alarga hasta el día 7. Es posible que la propia carga genética de estos embriones sea la causa principal del retraso en su desarrollo, por este motivo, se recomienda el uso de PGT-A para garantizar la transferencia de embriones euploides.

Además, la edad de la paciente también se encuentra directamente relacionada con una mayor tasa de aneuploidía embrionaria y un desarrollo más lento de los embriones.

Otro aspecto que se debe tener en cuenta es la sincronía endometrial. La transferencia de blastocistos en día 7 parece que puede provocar la desincronización entre el estado del embrión y el endometrio de la paciente. En condiciones *in-vivo*, una vez que se ha producido la fecundación, el cigoto se divide en múltiples células mientras se produce su migración hacia el útero. Una vez consigue llegar, su desarrollo hasta blastocisto ha sido completado y se produce la implantación, pero para que esta última sea exitosa, el endometrio debe tener un grosor y vascularización óptimos para permitir el crecimiento y desarrollo del embrión hasta que se produzca la formación de la placenta.

Si el blastocisto se transfiere antes o después de que el endometrio se encuentre en fase receptiva, se reducen bastante las posibilidades de la implantación, en este caso, la mejor solución como se mencionó anteriormente es llevar a cabo una transferencia en diferido que se ha visto que disminuye la diferencia entre los resultados reproductivos de día 7 y días anteriores.

Para sostener el desarrollo de estos embriones es muy importante tener en cuenta que debemos utilizar medios de cultivo capaces de soportarlo y que dependerá de cada clínica encontrar aquel medio de cultivo que le produzca mejores resultados. Aquellas clínicas que no apuesten por un buen cultivo embrionario siempre obtendrán mejores resultados transfiriendo los embriones en día 3.

La búsqueda del desarrollo del embrión hasta el estado de blastocisto se realiza con el objetivo de someter a los embriones resultantes a un proceso de selección embrionaria que, actualmente, se basa en la morfología. Aun así, este método no resulta muy preciso pues se ha observado que una vez que se conoce la euploidía de los embriones la “*calidad morfológica*” de los mismos no asegura mayores tasas de éxito.

Entre las ventajas del cultivo prolongado de embriones se destaca el incremento de las probabilidades de éxito en ciclos con un bajo número de embriones y/o cohortes de embriones de desarrollo lento. Estas pacientes suelen tener más de 35 años, y el cultivo prolongado les brinda la oportunidad de obtener embriones viables y usables, con tasas de éxito significativas.

No obstante, también hay que considerar algunas desventajas. El cultivo prolongado implica un aumento en el coste tanto para el laboratorio como para la paciente. En estos casos, se aconseja realizar el análisis genético preimplantacional (PGT-A) para evitar la transferencia de embriones aneuploides, de hecho, se ha observado que una vez que se conoce el estado euploide del embrión, las tasas de éxito reproductivo son similares o ligeramente reducidas en comparación con embriones de días anteriores. <sup>(18)</sup>

## **Conclusiones**

Los resultados de los diferentes estudios que han sido publicados hasta la fecha arrojan esperanza en el uso de blastocistos en día 7. El cultivo prolongado ha demostrado ser una estrategia prometedora para mejorar las tasas de éxito reproductivo en ciertos perfiles de pacientes. Esto es especialmente relevante para pacientes de mayor edad o aquellas que hayan sufrido ciclos previos fallidos, donde la selección adecuada de embriones es crucial para lograr un embarazo exitoso. Alargando el cultivo hasta el día 7 permitiría a los embriones llegar al estado de blastocisto y poder ser seleccionados para transferencia.

Uno de los mayores problemas de estos embriones es la elevada tasa de aneuploidías que presentan, que resultaría en un fallo de implantación. Mediante la realización del PGT-A se reduciría la tasa de aneuploidías y aumentaría la probabilidad de transferencia de un embrión euploide, de hecho, se recomienda que todos los ciclos que dispongan de embriones cultivados hasta día 7 lleven a cabo este diagnóstico genético para evitar fallos de implantación. Sin embargo, esto conlleva ciertas desventajas, ya que aumentaría el

coste del ciclo tanto para los pacientes como para el centro de reproducción asistida (En este último caso debido al aumento del tiempo de cultivo en el laboratorio).

A pesar de que los datos expuestos en este TFM sugieren que la transferencia embrionaria en día 7 se trata de una opción viable, es importante tener en cuenta algunas de las limitaciones que presenta el mismo. La mayoría de los estudios incluidos en este trabajo, poseen un tamaño de muestra limitado ya que no son muchas las clínicas que realizan la transferencia de embriones en día 7 y, además, esta se realizará siempre y cuando no existan blastocistos de días anteriores para la paciente, por lo que a su vez los embriones de D7 poseen una representación bastante menor con respecto al resto.

También se debe tener en cuenta que se trata de una práctica novedosa que debe seguir siendo estudiada y seguirá arrojando nuevos resultados para permitir una mejor evaluación del éxito reproductivo de estos embriones. Resultaría sumamente interesante conocer los mecanismos por los que se produce el retraso en el desarrollo del embrión y de qué manera las aneuploidías influyen en esto.

Debido a la escasa aplicación de esta técnica, sería muy útil evaluar la relación entre coste y efectividad para guiar a otros centros de reproducción asistida sobre la implementación de la misma en su práctica diaria. Entre las futuras líneas de investigación que resultarían de interés para avanzar en la transferencia de embriones se incluye por supuesto la mejora de la selección embrionaria, desarrollando técnicas más precisas que evalúen la viabilidad y el potencial reproductivo de los embriones. También son necesarios estudios de factores pronóstico que permita identificar aquellos que puedan predecir la viabilidad y el éxito de embriones cultivados hasta día 7.

Por último, la mejora de los cultivos embrionarios es un paso necesario para dar un soporte de desarrollo mejor que permita aumentar la calidad de los embriones producidos en el laboratorio.

Estas son solo algunas de las posibles líneas de investigación que podrían contribuir a mejorar la eficacia y los resultados de la transferencia de embriones de día 7 en el futuro. A medida que avance la ciencia y se desarrolle un mayor conocimiento en el campo de la reproducción asistida, se espera que surjan nuevas oportunidades y desafíos que requerirán una investigación continua y una colaboración interdisciplinaria.

## Bibliografía

1. Biggers, J. D. (2012). *IVF and embryo transfer: Historical origin and development*. *Reproductive BioMedicine Online*, 25(2), 118-127.  
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.04.011>
2. Rock, J., & Menkin, M. F. (1944). *In Vitro Fertilization and Cleavage of Human Ovarian Eggs*. *Science*, 100(2588), 105-107.  
<https://doi.org/10.1126/science.100.2588.105>
3. Glujovsky, D., Quinteiro Retamar, A. M., Alvarez Sedo, C. R., Ciapponi, A., Cornelisse, S., & Blake, D. (2022). *Cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in assisted reproductive technology*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2022(6).  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD002118.pub6>
4. Günther, V., Dasari-Mettler, A., Mettler, L., Otte, S. V., Ackermann, J., Maass, N., & Alkatout, I. (2022). *Is Blastocyst Culture Responsible for Higher Pregnancy Rates? A Critical Analysis of the Day of Optimal Embryo Transfer and Embryo Quality*. *JBRA Assisted Reproduction*.  
<https://doi.org/10.5935/1518-0557.20210098>
5. Corti, L., Cermisoni, G. C., Alteri, A., Pagliardini, L., Ambrosini, G., Andrisani, A., Papaleo, E., Viganò, P., & Noventa, M. (2022). *Clinical Outcomes Deriving from Transfer of Blastocysts Developed in Day 7: A Systematic Review and Meta-Analysis of Frozen-Thawed IVF Cycles*. *Reproductive Sciences*, 29(1), 43-53.  
<https://doi.org/10.1007/s43032-020-00424-y>
6. Kovalevsky, G., Carney, S. M., Morrison, L. S., Boylan, C. F., Neithardt, A. B., & Feinberg, R. F. (2013). *Should embryos developing to blastocysts on day 7 be cryopreserved and transferred: An analysis of pregnancy and implantation rates*. *Fertility and Sterility*, 100(4), 1008-1012.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.06.021>
7. Chronopoulou, E., & Harper, J. C. (2015). *IVF culture media: Past, present and future*. *Human Reproduction Update*, 21(1), 39-55.  
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmu040>

8. Gardner, D., & Lane, M. (2002). *Development of Viable Mammalian Embryos In Vitro: Evolution of Sequential Media*. En *Principles of Cloning* (pp. 187-213). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-012174597-4/50011-9>
9. Ortega-Jaen, D., Martin, A., Pardiñas, M. L., Mifsud, A., Mercader, A., & De Los Santos, M. J. (2022). *Extended embryo culture up to 14 days*. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 9(3), 100118.  
<https://doi.org/10.1016/j.medre.2022.100118>
10. Swain, J. (2015). *Optimal Human Embryo Culture*. *Seminars in Reproductive Medicine*, 33(02), 103-117. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546423>
11. Hammond, E. R., Cree, L. M., & Morbeck, D. E. (2018). *Should extended blastocyst culture include Day 7?* *Human Reproduction*, 33(6), 991-997.  
<https://doi.org/10.1093/humrep/dey091>
12. Niu, X., Wang, C. T., Li, R., Haddad, G., & Wang, W. (2020). *Is day 7 culture necessary for in vitro fertilization of cryopreserved/warmed human oocytes?* *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), 4.  
<https://doi.org/10.1186/s12958-020-0565-9>
13. Huang, J., Yang, X., Wu, J., Kuang, Y., & Wang, Y. (2020). *Impact of Day 7 Blastocyst Transfer on Obstetric and Perinatal Outcome of Singletons Born After Vitriified-Warmed Embryo Transfer*. *Frontiers in Physiology*, 11, 74.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00074>
14. Du, T., Wang, Y., Fan, Y., Zhang, S., Yan, Z., Yu, W., Xi, Q., Chen, Q., Mol, B. W., Lyu, Q., & Kuang, Y. (2018). *Fertility and neonatal outcomes of embryos achieving blastulation on Day 7: Are they of clinical value?* *Human Reproduction*, 33(6), 1038-1051.  
<https://doi.org/10.1093/humrep/dey092>
15. Su, Y., Li, J.-J., Wang, C., Haddad, G., & Wang, W.-H. (2016). *Aneuploidy analysis in day 7 human blastocysts produced by in vitro fertilization*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 20.  
<https://doi.org/10.1186/s12958-016-0157-x>
16. Hernandez-Nieto, C., Lee, J. A., Slifkin, R., Sandler, B., Copperman, A. B., & Flisser, E. (2019). *What is the reproductive potential of day 7 euploid embryos?* *Human Reproduction*, 34(9), 1697-1706.

- <https://doi.org/10.1093/humrep/dez129>
17. Whitney, J. B., Balloch, K., Anderson, R. E., Nugent, N., & Schiewe, M. C. (2019). *Day 7 blastocyst euploidy supports routine implementation for cycles using preimplantation genetic testing*. *JBRA Assisted Reproduction*, 23(1), 45-50. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180089>
  18. Tiegs, A. W., Sun, L., Patounakis, G., & Scott, R. T. (2019). *Worth the wait? Day 7 blastocysts have lower euploidy rates but similar sustained implantation rates as Day 5 and Day 6 blastocysts*. *Human Reproduction*, 34(9), 1632-1639. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez138>
  19. Franasiak, J. M., Forman, E. J., Patounakis, G., Hong, K. H., Werner, M. D., Upham, K. M., Treff, N. R., & Scott, R. T. (2018). *Investigating the impact of the timing of blastulation on implantation: Management of embryo-endometrial synchrony improves outcomes*. *Human Reproduction Open*, 2018(4), hoy022. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoy022>
  20. Cimadomo, D., Soscia, D., Casciani, V., Innocenti, F., Trio, S., Chiappetta, V., Albricci, L., Maggiulli, R., Erlich, I., Ben-Meir, A., Har-Vardi, I., Vaiarelli, A., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2022). *How slow is too slow? A comprehensive portrait of Day 7 blastocysts and their clinical value standardized through artificial intelligence*. *Human Reproduction*, 37(6), 1134-1147. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac080>
  21. Capalbo, A., Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Elliott, T., Wright, G., Nagy, Z. P., & Ubaldi, F. M. (2014). *Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: An observational study in two centers involving 956 screened blastocysts*. *Human Reproduction*, 29(6), 1173-1181. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu033>
  22. Forman, E. J., Upham, K. M., Cheng, M., Zhao, T., Hong, K. H., Treff, N. R., & Scott, R. T. (2013). *Comprehensive chromosome screening alters traditional morphology-based embryo selection: A prospective study of 100 consecutive cycles of planned fresh euploid blastocyst transfer*. *Fertility and Sterility*, 100(3), 718-724. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.043>