



## UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche ed Oncologia  
Dipartimento di Scienze Chirurgiche

XXX Ciclo

**Il trasferimento in utero di un embrione di scarsa qualità associato ad uno di buona qualità ha effetto sull'outcome della Fecondazione in Vitro rispetto al transfer del solo embrione di buona qualità?**

Relatore: Prof.ssa Chiara Benedetto

Tutor: Prof. Alberto Revelli

Candidata: Francesca Evangelista

## Indice

---

Capitolo 1: Introduzione	pag 3
1.1 Morfologia embrionaria in Day 2 e “outcomes“ della Fecondazione in Vitro	pag 4
1.2 Morfologia embrionaria e “Time Lapse”	pag 7
1.3 Analisi morfologica degli embrioni	pag 8
1.3.1 <i>“Construction of an evidence-based integrated         morphology cleavage embryo score for implantation         potential of embryos scored and transferred on Day 2         after oocyte retrieval”</i>	pag 9
1.3.2 <i>“The Istanbul consensus workshop on embryo         assessment: proceedings of an expert meeting”</i>	pag 13
Capitolo 2: Materiali e Metodi	pag 15
2.1 Disegno dello studio	pag 15
2.2 Protocollo di stimolazione ovarica	pag 16
2.3 Prelievo ovocitario	pag 16
2.4 Preparazione del Liquido Seminale	pag 17
2.5 Inseminazione	pag 17
2.6 Controllo della fecondazione e coltura embrionaria	pag 18
2.7 Valutazione morfologica degli embrioni	pag 18
2.8 Embryo Transfer – ET	pag 19
2.9 Esito del trattamento	pag 19
2.10 Analisi dei dati	pag 20
2.11 Analisi statistica	pag 20
Capitolo 3: Risultati	pag 22
3.1 Analisi dei Cinque gruppi di studio	pag 24
Capitolo 4: Discussione	pag 30
Capitolo 5: Conclusione	pag 37
6: Bibliografia	pag 38

## Capitolo 1: Introduzione

---

La qualità embrionaria è da sempre considerata uno dei principali fattori in grado di influenzare l'esito di un trattamento di Fecondazione in Vitro (IVF) pertanto la selezione degli embrioni da trasferire è uno dei punti fondamentali per la buona riuscita di un trattamento (Puissant et al 1987; Staessen et al 1992; Steer et al 1992; Shulman et al 1993; Giorgetti et al 1995; Van Royen et al 1999; Hardarson et al 2001; Terriou et al 2001; Hunault et al 2002; Oron G 2014, Zhu J et al 2014). Nonostante l'introduzione di nuove valutazioni non invasive per l'analisi degli embrioni, come ad esempio l'analisi del secretoma e del microbioma e lo studio morfocinetico dello sviluppo embrionale, ad oggi nella maggiore parte dei laboratori di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) gli embrioni dei cicli non destinati a diagnosi o screening genetico preimpianto vengono ancora valutati e selezionati secondo un criterio morfologico.

Negli ultimi decenni sono state proposte diverse classificazioni per la valutazione embrionale ma tutt'ora non esiste un metodo validato e uniformemente applicato nei diversi laboratori. L'assenza di un metodo comune di valutazione embrionale rende difficile, se non addirittura impossibile, l'analisi ed il confronto dei dati tra diversi centri creando problemi anche nell'interpretazione dei risultati di studi multicentrici.

Molti studi in letteratura hanno dimostrato una forte associazione tra gli aspetti morfologici dell'embrione e le percentuali di impianto e di gravidanza evolutiva (Oron et al 2014; Ziebe et al 1997 Alikani et al 2000; Ebner et al., 2003; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Tuttavia, trattandosi di un'osservazione di tipo statico, presenta grossi limiti sia per quanto riguarda la soggettività dell'analisi che può infatti variare da operatore ad operatore, sia dal punto di vista del tempo in cui vengono valutati gli embrioni. Un embrione osservato in un determinato momento di sviluppo può, infatti, apparire completamente diverso se osservato anche solo ad un'ora di differenza. Pertanto il reale potenziale di impianto e l'influenza di un embrione definito di scarsa qualità morfologica non è ancora chiaro ed in letteratura sono presenti dati contrastanti.

Ad oggi la comunità scientifica è sempre più orientata verso il trasferimento di un singolo embrione (Single Embyo Transfer – SET) per ridurre al minimo i rischi di

gravidanza gemellare con conseguenti complicanze materne e fetali. complicazioni. Tuttavia, sono ancora tanti i centri in cui si decide di trasferire due embrioni (Double Embryo Transfer – DET) in seconda giornata di sviluppo. Nelle pazienti destinate a DET in cui si osserva la presenza di due embrioni con score morfologico discordante, il quesito che ci si pone è, quindi, se il trasferimento dell'embrione di scarsa qualità possa influenzare l'esito del trattamento.

### 1.1 Morfologia embrionaria in Day 2 e “outcomes” della Fecodazione in Vitro

I principali aspetti morfologici analizzati nei diversi metodi di valutazione embrionale sono la frammentazione, la presenza di blastomeri multinucleati, la velocità e la simmetria di clivaggio.

Analizziamo nel dettaglio questi eventi.

#### a) Frammentazione

I frammenti sono strutture extracitoplasmatiche anucleate collegate alla membrana cellulare. L'incidenza della frammentazione negli embrioni in via di sviluppo è difficile da valutare e in prima analisi è necessario distinguere correttamente i frammenti cellulari dai blastomeri veri e propri. Johansson e collaboratori hanno definito i frammenti come cellule con un diametro  $< 45 \mu\text{m}$  negli embrioni in seconda giornata di sviluppo, e con diametro  $< 40 \mu\text{m}$  negli embrioni in Day 3.

Vari studi in letteratura hanno osservato una correlazione negativa tra la presenza di embrioni con un'alta percentuale di frammenti e l'instaurarsi di una gravidanza, la presenza di pochi frammenti, invece, sembra non influenzare l'impianto in utero (Giorgetti et al 1995; Ziebe et al 1997; Van Roye et al 1999-2001). Piccoli frammenti sembrano, infatti, svanire o grazie alla lisi cellulare o addirittura grazie ad un meccanismo di riassorbimento cellulare che si osserva nei successivi stadi di sviluppo durante la coltura (Hardarson et al 2001; Van Blerkom et al 2001).

Anche Van Royen e collaboratori nel 2003 hanno affermato che una frammentazione  $< 10\%$  in un embrione sembra non incidere sulla probabilità di impianto e anche un ulteriore studio, analizzando il trasferimento singolo di 1273 embrioni a 4 cellule ha affermato che la presenza di frammenti fino al 20% dell'embrione non influenza le probabilità di gravidanza. Nello stesso studio, però, si evidenzia come embrioni con frammentazione tra il 10 ed il 20% ma con blastomeri di dimensione irregolare presentino la stessa probabilità di gravidanza

degli embrioni con frammentazione >20%. Pertanto, la frammentazione è un aspetto importante nella valutazione della morfologia embrionaria ma non dovrebbe essere l'unico parametro analizzato.

#### b) Multinucleazione

Un blastomero che presenta più di un nucleo al suo interno è definito multinucleato. La presenza di blastomeri multinucleati è considerata anormale e i dati sono stati ottenuti sia *in vivo* sia *in vitro* (Hertig et al 1954; Tesarik et al 1987). Dai dati in letteratura emerge un'associazione tra la presenza di blastomeri multinucleati e la presenza di anomalie cromosomiche così come si osserva un'associazione anche con un'alta percentuale di frammentazione (Kligman et al 1996; Hardarson et al 2001; Van Royen et al 2003). La presenza di blastomeri multinucleati è stata anche associata ad una dimensione irregolare dei blastomeri (Hardarson et al 2001) influenzando in modo negativo il potenziale di impianto degli embrioni (Jackson et al 1998; Pelinck et al 1998; Hardarson et al 2001; Van Royen et al 2003; Holte et al 2007). E' anche vero, però, che alcuni studi in letteratura hanno osservato che allo stadio di 2 cellule si ha un'elevata percentuale di blastomeri multinucleati ma che questa percentuale si riduce drasticamente allo stadio di 4 cellule e ulteriormente al terzo giorno di sviluppo embrionale, sostenendo quindi una tesi a favore della presenza di un meccanismo di auto correzione dell'embrione stesso. Infatti Balakier e collaboratori hanno, ad esempio, osservato come il 56,8% degli embrioni multinucleati allo stadio di 2 cellule si sviluppi in blastocisti di buona qualità e che di queste circa il 50% risulti euploide in seguito a screening genetico preimpianto.

#### c) Velocità di clivaggio.

Il clivaggio dell'embrione si identifica con i primi stadi della duplicazione cellulare che danno origine, attraverso una serie di divisioni mitotiche, ad un embrione formato da numerose cellule dette blastomeri. La divisione cellulare è uno dei più importanti indicatori di vitalità e competenza embrionaria ed il numero di blastomeri è uno dei principali fattori predittivi di qualità embrionaria, impianto e probabilità di gravidanza (Van Royen et al., 1999; Alikani et al., 2000; Fisch et al., 2001). La velocità di clivaggio ottimale di un embrione è stata definita dalla Consensus di Istanbul nel 2011 e prevede in Day 1 ( $26 \pm 1$  h post-

ICSI,  $28 \pm 1$  h post-IVF) 2 cellule, in Day 2 ( $44 \pm 1$  h) 4 cellule e in Day 3 ( $68 \pm 1$  h) 8 cellule (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Negli embrioni in cui si osserva precocemente la prima divisione mitotica si è di fronte ad un fenomeno chiamato “early cleavage”. Dati in letteratura hanno mostrato come questo fenomeno correli con lo sviluppo di embrioni di buona qualità con maggiori probabilità di impianto (Lundin et al., 2001; Fenwick et al., 2002). Numerosi studi, inoltre, hanno osservato come il trasferimento di un embrione a 4 cellule in Day 2 aumenti in modo significativo le probabilità di impianto e gravidanza rispetto al trasferimento di embrioni sia con un minor numero di cellule che con un maggior numero (Edwards et al 1980; Giorgetti et al 1995; Ziebe et al 1997; Van Royen et al 1999;2001, Thurin et al., 2005; Holte et al., 2007; Scott et al., 2007).

#### d) Simmetria di clivaggio

Un embrione i cui blastomeri presentino  $>1/3$  di differenza in dimensione è definito asimmetrico (Puissant et al 1987). Lo sviluppo di questi embrioni “asimmetrici” e il loro impatto negativo sugli outcomes della Fecondazione in Vitro è stato a lungo discusso in letteratura (Giorgetti et al 1995; Ziebe et al 1997; Hardarson et al 2001). Inoltre, l’analisi genetica di questi embrioni correla con la presenza di anomalie cromosomiche (Hardarson et al 2001).

La maggior parte degli studi presenti in letteratura hanno analizzato le caratteristiche morfologiche degli embrioni confrontandole singolarmente con gli esiti dei trattamenti. Solo pochi studi hanno invece valutato l’interdipendenza di questi parametri considerandoli insieme per valutarne l’influenza sulla capacità di impianto.

Sjoblom e collaboratori nel 2006, ad esempio, hanno identificato in seconda giornata di sviluppo embrionale 5 parametri (aspetto del citoplasma, aspetto dei pronuclei e dei nucleoli, anomalie citoplasmatiche, numero di blastomeri e presenza di blastomeri multinucleati) che insieme correlano con l’impianto in utero. Allo stesso modo, Scott e collaboratori hanno osservato come un’asimmetria dei pronuclei in Day 1 associata alla presenza di blastomeri di dimensioni differenti e multinucleati in Day 2 fosse correlata ad una bassa probabilità di impianto in utero.

In un ulteriore studio, con lo scopo di valutare l'interdipendenza delle caratteristiche morfologiche analizzate, è stata eseguita una regressione logistica dei diversi parametri, Holte e collaboratori hanno, infatti, valutato l'esito di 2266 embrioni trasferiti in Day 2 e hanno generato uno score morfologico integrato (ICM: Integrated Morphology Cleavage embryo score) che correla con la probabilità di impianto in utero. L'ICM include i seguenti parametri: numero di blastomeri, dimensione dei blastomeri e presenza di blastomeri multinucleati. In un altro studio ancora, basato sull'osservazione di 4042 embrioni, si è osservato come il numero di blastomeri in Day 2 e l'incidenza dell'early cleavage fossero parametri predittivi per lo sviluppo di blastocisti di buona qualità (Guerif et al 2007).

In conclusione, ad oggi non esiste ancora un metodo validato e uniformemente applicato per l'analisi morfologica, pertanto per classificare e attribuire uno "score" agli embrioni è opportuno considerare tutti i diversi parametri morfologici

### 1.2 Morfologia embrionaria e "Time Lapse".

Correntemente la valutazione morfologica dell'embrione rappresenta il criterio di selezione maggiormente utilizzato per l'identificazione dell'embrione con più alta probabilità di impianto; tuttavia per effettuare tale valutazione è necessario osservare gli embrioni a tempi stabiliti, ma soprattutto esporli più volte a condizioni non ideali per il loro sviluppo, tenendoli fuori dall'incubatore. Pertanto, al fine di valutare la qualità degli embrioni senza perturbarne le condizioni di coltura, negli ultimi anni è stata proposta l'indagine morfocinetica dell'embrione. La coltura embrionale in "time-lapse" ("intervallo di tempo") permette, mediante l'utilizzo di apposite telecamere, un'osservazione continua del tempo di divisione delle cellule che costituiscono l'embrione, dalla fecondazione dell'ovocita fino allo stadio di blastocisti (Day 5 / Day 6 di sviluppo). Inoltre, grazie all'impiego di appositi software è possibile creare una sequenza di immagini accelerata in Time Lapse (che significa appunto "intervallo di tempo") dello sviluppo embrionario (Castello D et al 2016; Omidi M et al 2017; Armstrong S et al 2018). Questa tecnologia permette, quindi, di registrare dettagliate informazioni sullo sviluppo embrionario come la comparsa e

scomparsa dei pronuclei di fecondazione, la velocità delle divisioni cellulari, gli intervalli tra i cicli cellulari e altri eventi e caratteristiche durante lo sviluppo fino alla formazione ed espansione della blastocisti; poiché si tratta di eventi transitori, i dati ad essi correlati non sono rilevabili mediante una valutazione morfologica statica al microscopio (Kovacs P et al 2014). I parametri morfocinetici ottenuti tramite la tecnologia “Time Lapse” potrebbero costituire, quindi, dei potenziali indicatori non invasivi di qualità embrionaria. Ad esempio, grazie al “Time Lapse”, è stato possibile valutare come da un lato sia molto importante il tempo in cui avvengono le divisioni cellulari ma dall’altro è altrettanto importante il tempo intercorso tra una divisione cellulare e l’altra. Se tutti i blastomeri si dividessero in esatta sincronia si dovrebbero infatti osservare solamente embrioni allo stadio di 2-4 o 8 cellule. Tuttavia, è frequente valutare embrioni allo stadio di 3-5-6-7-9 cellule in cui, quindi, è avvenuta una divisione cellulare asincrona (Scott et al 2007; Lemmen et al 2008; Wong et al 2010; Meseguer et al 2011; reviewed by Kirkegaard et al 2012). La durata delle divisioni cellulari durante le fasi di clivaggio dell’embrione, ad esempio, è stato dimostrato essere un indicatore importante per predire lo sviluppo a blastocisti (Liu et. al, 2014).

Tuttavia, ad oggi, l’impiego nella pratica clinica del sistema “Time Lapse” rimane controverso: solo alcuni studi hanno dimostrato un effettivo aumento del tasso di gravidanze grazie a questa tecnologia (Kaser DJ et al 2014; Pribenszky C et al 2017), mentre altri non hanno riscontrato nessuna variazione significativa rispetto alla classica valutazione morfologica (Kirkegaard K et al 2015; Goodman LR et al 2016). Inoltre non sono ancora emersi dei marcatori cinetici di qualità embrionale univoci e condivisi da tutta comunità scientifica.

### 1.3 Analisi morfologica degli embrioni.

In letteratura, per rendere meno soggettiva l’analisi morfologica degli embrioni sono stati proposti diversi metodi di osservazione. In particolare nel 2007 Holte e collaboratori hanno proposto uno score morfologico integrato (ICM), basato sull’evidenza, che correla con la probabilità di impianto in utero (Holte et al 2007). Nel 2011, invece, l’esecutivo dell’ASRM (Alpha Scientists In Reproductive Medicine) e i rappresentanti del SIG (Special Interest Group) di embriologia dell’ESHRE, in risposta alla necessita di avere un “consensus”

internazionale sulla valutazione morfologica degli embrioni, si sono riuniti per stabilire dei criteri morfologici comuni per classificare e scorare gli embrioni (Alpha Scientists in Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology. 2011).

1.3.1 *“Costruzione di uno score morfologico integrato basato sull’evidenza per predire il potenziale di impianto degli embrioni valutati allo stadio di clivaggio e trasferiti in Day 2 in seguito al prelievo degli ovociti”*

*“Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on Day 2 after oocyte retrieval”*

Nel 2007 Holte e collaboratori, nel tentativo di rendere meno soggettiva la valutazione morfologica embrionaria, hanno proposto uno score morfologico, basato sull'evidenza, in grado di correlare con l'impianto in utero.

Lo studio di Holte e collaboratori 'analisi è stato eseguito su 2266 embrioni trasferiti in Day 2 e i parametri morfologici analizzati includono il numero di blastomeri, la percentuale di frammentazione, la presenza di multinucleazione, la simmetria di clivaggio e la dimensione dei vari blastomeri.

Le caratteristiche morfologiche degli embrioni sono state assegnate come segue (Figura 1):

- *numero di blastomeri - BL:* con valori compresi tra 2 e > 6
- *frammentazione - FR:* 0 indica assenza di frammenti, 1 indica un numero di frammenti inferiore al 10%, 2 indica un numero di frammenti tra il 10% e il 25%, 3 indica un numero di frammenti tra il 26% e il 49% e infine 4 indica un numero di frammenti superiore al 50%
- *nuclearità - NU:* questo punteggio si ottiene dividendo il numero di blastomeri mononucleati per il numero totale dei blastomeri. In questo modo si ottiene un punteggio pari a 0 per valori compresi tra 0 e 0,25; score pari a 1 per un rapporto di 0,25-0,50; score 2 per un rapporto di 0,50-0,75; score 3 per rapporti superiori allo 0,75. In caso di blastomeri multinucleati, si ottiene score di -1
- *dimensione dei blastomeri - EQ:* prevede un punteggio da 0 a 2. Score pari a 0 indica la presenza di blastomeri di uguale dimensione, score pari a 1 indica una

variazione di grandezza minore del 50%, mentre score pari a 2 indica a una variazione di grandezza superiore al 50%

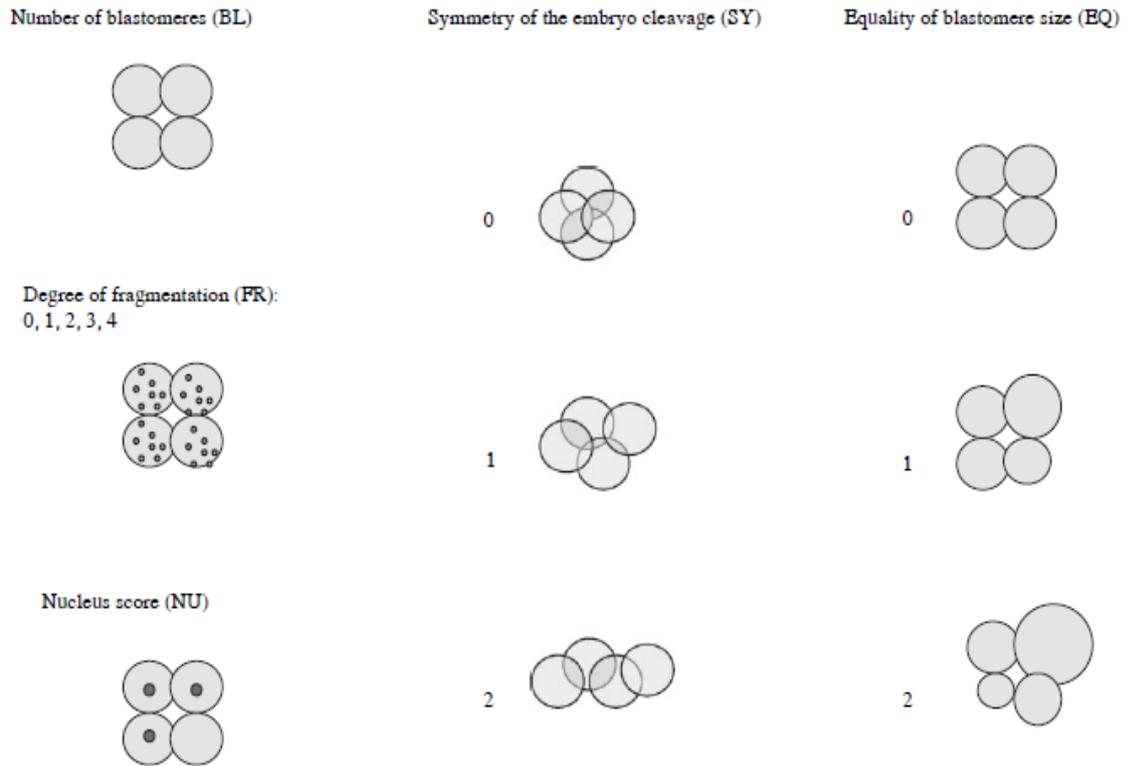
- *simmetria nel clivaggio -SY*: anche questo parametro ha uno score compreso tra 0 e 2. Score pari a 0 indica una completa simmetria di divisione dei blastomeri rispetto agli assi cartesiani tridimensionalmente; score pari a 1 indica una leggera asimmetria; score pari a 2 indica una notevole asimmetria.

Tutti e cinque i parametri morfologici considerati, se analizzati singolarmente, correlano con le probabilità di impianto in utero. Effettuando invece un'analisi di regressione multipla si osserva come solamente le tre variabili BL, EQ e NU rimangono significative correlando positivamente con l'impianto in utero.

Sulla base di quanto emerso, Holte e collaboratori hanno costruito uno score morfologico integrato (IMC) per l'analisi embrionale in seconda giornata di sviluppo tenendo conto delle tre variabili coinvolte, generando così per ogni embrione uno score da 0 a 10. Secondo questa classificazione ad un embrione "top score", con 4 blastomeri nucleati di ugual dimensione, viene assegnato uno score di 10, mentre ad esempio ad un embrione con 2 blastomeri di dimensione diversa tra loro e multinucleato viene assegnato uno score 2.

Nella figura 2 sono riassunti gli score da 0 a 10 per ogni combinazione di BL, EQ e NU.

L'applicazione di questo score integrato permette quindi di selezionare gli embrioni con il maggiore potenziale di impianto da trasferire in utero.



**Figure 1.** Embryo variables. Number of blastomeres (BL: 2, 3, 4, 5 or  $\geq 6$  blastomeres). Degree of fragmentation (FR): 0, no; 1,  $\leq 10\%$ ; 2,  $>10 \leq 25\%$ ; 3,  $>25 \leq 50\%$  and 4,  $>50\%$  fragmentation. Variation of sizes of the blastomeres ('Equality', EQ): 0 = uniform size of the blastomeres, 1 = varying size but  $<50\%$  variation and 2 = more than  $50\%$  variation in blastomere size. Symmetry of the cleavage ('Symmetry', SY): 0 = full symmetry of the cleaved embryo, 1 = slightly asymmetric cleavage and 2 = pronounced asymmetry. The parameter 'Nucleus score' (NU) was defined as the number of visible mononucleated blastomeres divided by the total number of blastomeres in the embryo (to correct for cleavage rate); Nucleus score 0 = a ratio of  $0-0.25$ ; Nucleus score 1 = ratio  $>0.25-0.50$ ; Nucleus score 2 = ratio  $>0.50-0.75$  and Nucleus score 3 = ratio  $>0.75$ . Nucleus score  $-1$  denotes that the embryo contains at least one multinucleated blastomere.

**Figura 1:** Descrizione dei parametri morfologici (Holte et al 2007).

Blastomere	Equality	Number of nuclei	IMC score	Blastomere	Equality	Number of nuclei	IMC score
2	0	M	2.8	6	0	2	7.9
2	0	0	3.5	6	0	3	7.9
2	0	1	4.1	6	0	4	8.5
2	0	2	5.4	6	0	5	9.1
2	1	M	1.9	6	0	6	9.1
2	1	0	2.6	6	1	M	5.7
2	1	1	3.2	6	1	0	6.3
2	1	2	4.5	6	1	1	6.3
2	2	M	1.0	6	1	2	6.9
2	2	0	1.6	6	1	3	6.9
2	2	1	2.3	6	1	4	7.6
2	2	2	3.6	6	1	5	8.2
3	0	M	5.1	6	1	6	8.2
3	0	0	5.8	6	2	M	4.7
3	0	1	6.4	6	2	0	5.4
3	0	2	7.1	6	2	1	5.4
3	0	3	7.7	6	2	2	6.0
3	1	M	4.2	6	2	3	6.0
3	1	0	4.9	6	2	4	6.7
3	1	1	5.5	6	2	5	7.3
3	1	2	6.1	6	2	6	7.3
3	1	3	6.8				
3	2	M	3.3				
3	2	0	3.9				
3	2	1	4.6				
3	2	2	5.2				
3	2	3	5.9				
4	0	M	7.4				
4	0	0	8.1				
4	0	1	8.1				
4	0	2	8.7				
4	0	3	9.4				
4	0	4	10.0				
4	1	M	6.5				
4	1	0	7.2				
4	1	1	7.8				
4	1	2	7.8				
4	1	3	8.4				
4	1	4	9.1				
4	2	M	5.5				
4	2	0	6.2				
4	2	1	6.2				
4	2	2	6.9				
4	2	3	7.5				
4	2	4	8.2				
5	0	M	7.0				
5	0	0	7.6				
5	0	1	7.6				
5	0	2	8.3				
5	0	3	8.9				
5	0	4	9.6				
5	0	5	9.6				
5	1	M	6.0				
5	1	0	6.7				
5	1	1	6.7				
5	1	2	7.4				
5	1	3	8.0				
5	1	4	8.6				
5	1	5	8.6				
5	2	M	5.1				
5	2	0	5.8				
5	2	1	5.8				
5	2	2	6.4				
5	2	3	7.1				
5	2	4	7.7				
5	2	5	7.7				
6	0	M	6.6				
6	0	0	7.2				
6	0	1	7.2				

M in the column for number of nuclei denotes that at least one of the blastomeres was multinucleated. Please note that in this table, the actual number of observed nuclei is given to simplify its practical application. To calculate the Nucleus score used in the multiple model, see Material and methods.

**Figura 2:** Integrated morphology cleavage (IMC) embryo score per tutte le combinazioni di BL, EQ e NU (Holte et al 2007).

1.3.2 “*Consensus di Istanbul sulla valutazione degli embrioni: esiti di una riunione di esperti*”

“*The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting*”

Nel 2011, in seguito all’incontro di esperti nel settore, per quanto riguarda la valutazione morfologica in seconda e terza giornata, sono stati definiti i seguenti parametri morfologici:

- *Numero di blastomeri:* in seconda giornata di sviluppo ci si aspetta un embrione a 4 cellule, tenendo conto del tempo trascorso dall’inseminazione (Figura 3).
- *Frammentazione:* grado di frammentazione lieve (<10%), moderata (10%-25%), severa (>25%).
- *Presenza di blastomeri multinucleati:* la presenza anche solo di un blastomero avente più di un nucleo è sufficiente per considerare l’embrione multi nucleato
- *Dimensioni dei blastomeri:* gli embrioni allo stadio di 2,4,8 cellule devono presentare blastomeri di dimensioni regolari

In conclusione, basandosi sull’analisi di questi criteri morfologici è possibile avere (Figura 4):

- embrioni di Grado 1 – buona qualità – 4 blastomeri di dimensioni regolari, mononucleati, disposti a tetraedro e con frammentazione <10%
- embrioni di Grado 2 – qualità intermedia - frammentazione compresa tra il 10% e il 25%, una maggioranza dei blastomeri di dimensioni regolari e conformi allo stadio di sviluppo e assenza di multinucleazione;

- embrioni di grado 3 - scarsa qualità - frammentazione superiore al 25%, blastomeri di dimensioni irregolari non conformi allo stadio di sviluppo e presenza di blastomeri multinucleati.

**Table IV Timing of observation of fertilized oocytes and embryos, and expected stage of development at each time point.**

Type of observation	Timing (hours post-insemination)	Expected stage of development
Fertilization check	17 ± 1	Pronuclear stage
Syngamy check	23 ± 1	Expect 50% to be in syngamy (up to 20% may be at the 2 cell stage)
Early cleavage check	26 ± 1 h post ICSI 28 ± 1 h post IVF	2 cell stage
Day 2 embryo assessment	44 ± 1	4 cell stage
Day 3 embryo assessment	68 ± 1	8 cell stage
Day 4 embryo assessment	92 ± 2	Morula
Day 5 embryo assessment	116 ± 2	Blastocyst

ICSI. intracytoplasmic sperm injection.

**Figura 3:** Velocità di clivaggio rispetto al tempo intercorso tra l'inseminazione e l'osservazione degli embrioni (Alpha Scientists in Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology. 2011)

**Table VI Consensus scoring system for cleavage-stage embryos (in addition to cell number).**

Grade	Rating	Description
1	Good	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt; 10% fragmentation</li> <li>• Stage specific cell size</li> <li>• No multinucleation</li> </ul>
2	Fair	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10-25% fragmentation</li> <li>• Stage specific cell size for majority of cells</li> <li>• No evidence of multinucleation</li> </ul>
3	Poor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Severe fragmentation (&gt;25%)</li> <li>• Cell size not stage specific</li> <li>• Evidence of multinucleation</li> </ul>

**Figura 4:** Valutazione morfologica degli embrioni in seconda e terza giornata di sviluppo (Alpha Scientists in Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology. 2011)

### 2.1 Disegno dello studio

L'obiettivo di questo lavoro è valutare l'impatto della Fecondazione in Vitro sugli esiti clinici in seguito al trasferimento in utero di un embrione di scarsa qualità morfologica associato ad uno di buona qualità, confrontandolo con il transfer del solo embrione di buona qualità.

Nelle pazienti destinate a DET in cui si osserva la presenza di due embrioni con score morfologico opposto, il quesito che ci si pone è se il trasferimento dell'embrione di scarsa qualità possa in qualche modo influenzare l'esito del trattamento rispetto al transfer di un solo embrione di score elevato.

E' stato effettuato uno studio retrospettivo e sono stati analizzati i trattamenti di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) effettuati presso il Centro di Fisiopatologia della Riproduzione – Laboratorio FIVER dell'Ospedale Sant'Anna di Torino tra il 2008 ed il 2018.

Tutte le coppie in cui è stato effettuato il trasferimento a fresco di uno o due embrioni in seconda giornata di sviluppo (Day 2) sono state incluse nello studio, indipendentemente dalla tecnica impiegata per l'inseminazione (FIVET/ICSI). Per ridurre ogni "bias" sono però state escluse dallo studio le coppie aventi come indicazione al trattamento fattori maschili gravi, le coppie affette da patologie ereditarie e quelle in cui la paziente presentava anomalie uterine.

Sono stati osservati ed analizzati i trattamenti di 1542 coppie per un totale di 2373 embrioni valutati morfologicamente e trasferiti in utero. In 831 coppie è stato eseguito il trasferimento di due embrioni (DET) mentre in 711 è stato eseguito il trasferimento in utero di un solo embrione (SET). La maggior parte dei SET, 526 coppie, è stata di tipo non elettivo, ovvero al momento del trasferimento era presente un solo embrione disponibile, mentre per 185 coppie, a prognosi decisamente favorevole, è stato eseguito il trasferimento elettivo di un singolo embrione (eSET – Elective Single Embryo Transfer). In quest'ultima coorte di pazienti, basandosi sempre su criteri morfologici, l'embrione con score morfologico maggiore è stato selezionato per il trasferimento in utero. Ai fini

dello studio, per uniformare le caratteristiche delle pazienti si è deciso di considerare insieme il gruppo eSET con quello SET (Tabella 1).

	Totale	DET	SET	eSET
<b>Pazienti</b>				
<b>N° embrioni trasferiti</b>	1542	831 (53.9%)	526 (34.1%)	185 (12%)
	2373	1662	526	185

**Tabella 1:** Coppie incluse nello studio suddivise in base al numero di embrioni trasferiti in utero.

## 2.2. Protocollo di stimolazione ovarica

Per ciascuna paziente è stato selezionato il protocollo di stimolazione ovarica più adatto, basato sulla modulazione dell'attività ipofisaria tramite agonisti o antagonisti del GnRH seguita dalla somministrazione di gonadotropine purificate o ricombinanti (Puregon, MSD; Gonal-F, Merck; Menopur, Ferring) a dosaggio personalizzato compreso tra 100 e 450 UI/die.

La crescita follicolare è stata monitorata controllando a giorni alterni, a partire dal settimo giorno di stimolazione, sia i livelli di estradiolo sierici ( $17\beta$  estradiolo) sia la dimensione dei follicoli ovarici attraverso ecografie transvaginali, regolando di volta in volta la dose di gonadotropine. Al raggiungimento di livelli ematici di estradiolo pari a 1000-3000 pg/ml e con una dimensione dei follicoli maggiori pari almeno a 18 mm è stata somministrata per via intramuscolare gonadotropina corionica umana (hCG, Gonasi HP, IBSA) 10.000 UI per indurre l'ovulazione (triggering).

## 2.3 Prelievo ovocitario

A 36-38 ore dalla somministrazione di hCG è stato effettuato in anestesia locoregionale il prelievo degli ovociti (*oocyte pick-up*, *OPU*) tramite aspirazione ecoguidata dei follicoli per via transvaginale.

Il fluido follicolare è stato osservato allo stereomicroscopio e i complessi cumulo-ovocita, dopo esser stati lavati in apposito terreno (Flushing buffer, Cook, Irlanda), sono stati messi all'interno di capsule di Petri con anello centrale (60x15 mm, Style, Falcon, USA) contenenti terreno di coltura tamponato (Gamete buffer, Cook, Irlanda). Infine al termine del pick up gli ovociti recuperati sono stati posti

in un nuovo terreno di coltura (Fertilization Medium, COOK Medical) e mantenuti in incubatore a 37° C con 5% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> fino al momento della inseminazione.

#### 2.4 Preparazione del Liquido Seminale

I campioni di liquido seminale sono stati esaminati ed è stata valutata la concentrazione di spermatozoi, la motilità e la morfologia secondo le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 2010). Sono stati preparati e capacitati mediante centrifugazione a gradiente di densità in modo da selezionare gli spermatozoi dotati di motilità e morfologia normale.

L'intero volume di liquido seminale liquefatto è stato quindi stratificato su un gradiente di densità (Pure Sperm 45%-90% Nidacon, Svizzera) e centrifugato a 1500 rpm per 30 minuti. Il surnatante è stato in seguito rimosso e il pellet è stato risospeso in 1 ml di terreno di lavaggio (Gamete buffer COOK, Irlanda) ed ulteriormente centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti. Infine il pellet è stato risospeso in un volume finale variabile in base alla qualità del liquido seminale: i campioni con pochi spermatozoi sono stati risospesi in circa 0,5 ml di terreno mentre i campioni normospermici sono stati risospesi in circa 1 ml. La provetta contenete gli spermatozoi capacitati è stata mantenuta a T° ambiente fino al momento dell'inseminazione.

#### 2.5 Inseminazione

Dopo circa quattro ore dal prelievo ovocitario, i complessi cumulo-oofo - ovocita recuperati durante il prelievo ovocitario sono stati inseminati.

La scelta del tipo di inseminazione, FIVET (Fecondazione in Vitro) o ICSI (Iniezione Intracitoplasmatica dello Spermatozoo), è stata presa sia in base al numero di spermatozoi capacitati, sia in relazione alla storia clinica della coppia.

Gli ovociti destinati alla tecnica FIVET, così come sono stati recuperati durante il prelievo ovocitario, sono stati messi ad incubare in un'unica piastra di coltura insieme agli spermatozoi capacitati. Sono stati impiegati circa 200.000 spermatozoi capacitati per ovocita.

Gli ovociti destinati alla ICSI, invece, prima dell'inseminazione sono stati sottoposti a decoronizzazione, ovvero alla separazione delle cellule del cumulo oofo dall'ovocita sia mediante un'azione enzimatica, con l'impiego dell'enzima

Ialuronidasi (Irvine Scientific, Santa Ana, California), che meccanica, con l'ausilio di capillari con diametro di dimensioni decrescenti (Denuding Pipette – COOK – Irlanda). In seguito alla rimozione delle cellule del cumulo è stato possibile valutare la maturità degli ovociti; solamente gli ovociti maturi, ovvero quelli che si trovano allo stadio di metafase II e riconoscibili dall'estrusione del primo globulo polare, sono stati inseminati mediante tecnica ICSI. Diversamente gli ovociti risultati essere in metafase I (MI), allo stadio di vescicola germinale (GV) o che presentavano evidenti anomalie morfologiche non sono stati utilizzati.

## 2.6 Controllo della fecondazione e coltura embrionaria

Dopo circa 16-18 ore dall'inseminazione è stata valutata la corretta fecondazione degli ovociti. Gli ovociti sono stati considerati correttamente fecondati in caso di presenza evidente di due pronuclei (2PN - pronucleo maschile e pronucleo femminile); diversamente se presentavano nessuno, uno o più pronuclei sono stati considerati non fecondati o con fecondazione anomala e pertanto non tenuti in coltura.

Una volta valutata la fecondazione, gli ovociti sono stati messi nuovamente ad incubare fino a 48h, quando è stato possibile valutare l'avvenuto clivaggio.

## 2.7 Valutazione morfologica degli embrioni

La morfologia degli embrioni è stata valutata in seconda giornata di sviluppo (48h dopo l'inseminazione) analizzando i seguenti cinque parametri: numero di blastomeri, percentuale di frammentazione, simmetria di clivaggio dei blastomeri, dimensione dei blastomeri e presenza di nuclei all'interno dei blastomeri. In particolare, le variabili relative al numero di blastomeri, alla loro dimensione e alla presenza di blastomeri nucleati sono state utilizzate per generare uno score embrionario da 0 a 10 dove 10 corrisponde all'embrione top score. Tale score è stato statisticamente validato da studi in letteratura (Holte J et al 2007; Rehenman A et al 2015; Kebbon Vaegter K et al 2018).

Per questo elaborato di tesi gli embrioni con score morfologico  $\leq 5$  sono stati definiti embrioni di "cattiva" qualità (B – Bad) mentre gli embrioni con score  $> 5$  sono stati definiti di "buona" qualità (G – Good). In base alla qualità degli embrioni trasferiti (G e/o B) le pazienti reclutate sono quindi state suddivise in cinque gruppi di studio:

*Gruppo 1:* pazienti che hanno trasferito un singolo embrione di buona qualità (G)

*Gruppo 2:* pazienti che hanno trasferito un singolo embrione di scarsa qualità (B)

*Gruppo 3:* pazienti che hanno trasferito due embrioni di buona qualità (G+G)

*Gruppo 4:* pazienti che hanno trasferito due embrioni uno di buona qualità ed uno di qualità scarsa (G+B)

*Gruppo 5:* pazienti che hanno trasferito due embrioni di scarsa qualità (B+B)

## 2.8 Embryo Transfer - ET

In base alle caratteristiche cliniche della coppia, all'anamnesi pregressa e all'analisi morfologica degli embrioni, sono stati trasferiti in utero mediante catetere flessibile (Guardia Access – COOK –Irlanda) uno o due embrioni.

E' stato inoltre possibile servirsi di un modello predittivo di gravidanza clinica (%CPR - Clinical Pregnancy Rate Predicted) e di gemellarità (%TR - Twin Rate Predicted) basato su quattro diverse variabili della coppia: età della donna al trattamento, classificazione degli embrioni, sensitività ovarica (calcolata come il numero di ovociti recuperati in relazione alla dose di gonadotropine somministrate) e numero di precedenti trattamenti di Fecondazione in Vitro (Holte et al 2007, Rhenman et al 2015, Vaegter et al 2018). Inserendo queste variabili in un software che si basa su un algoritmo (Linnefiler), per ogni coppia, è stato quindi possibile stimare sia la probabilità di ottenere una gravidanza clinica (%CPR) sia la probabilità di avere una gravidanza gemellare (%TR). La decisione del numero di embrioni da trasferire, pertanto, è stata valutata anche basandosi su queste probabilità e le coppie con più del 19% di probabilità di gravidanza multipla sono state indirizzate al trasferimento di un singolo embrione.

## 2.9 Esito del trattamento

In seguito al trasferimento in utero degli embrioni è stata prescritta una terapia con Progesterone vaginale (Crinone 8 gel) per sostenere la successiva fase luteale, da utilizzare fino al test di gravidanza (dosaggio hCG sierico), da eseguire circa dodici giorni dopo il trasferimento embrionario. In presenza di test di gravidanza positivo è stata programmata un'ecografia transvaginale due settimane dopo, al fine di confermare la gravidanza in utero con presenza di attività cardiaca fetale. Eventuali valori borderline di hCG hanno richiesto la rivalutazione del dosaggio

dopo alcuni giorni in modo tale da distinguere una gravidanza in evoluzione, da una in rapido spegnimento (gravidanza biochimica).

Le pazienti sono state seguite per tutta la durata della gravidanza fino al termine e per ciascuna paziente è stato annotato anche il peso del bambino alla nascita .

### 2.10 Analisi dei dati

Al fine di fare chiarezza sul valore dell'aspetto morfologico nella selezione degli embrioni da trasferire in utero, i cinque gruppi di studio sono stati valutati e confrontati tra loro assumendo come gruppo controllo il gruppo numero 1 (G) composto da pazienti che hanno trasferito un singolo embrione di buona qualità.

Sono stati valutati ed analizzati i seguenti outcomes:

- % IR (Implantation Rate): rapporto tra il numero di sacchi gestazionali e il numero di embrioni trasferiti
- % PR/ET (Pregnancy Rate): rapporto tra le gravidanze (test di gravidanza positivo) e gli ET effettuati
- % CPR/ET (Clinical Pregnancy Rate): rapporto tra le gravidanze cliniche (test di gravidanza positivo con camera ovulare in utero e attività cardiaca) e gli ET effettuati
- % TR (Twin Rate): rapporto tra le gravidanze gemellari e le gravidanze ottenute
- % MR (Miscarriage Rate): rapporto tra le gravidanze interrotte e le gravidanze ottenute
- % LBR/ET (Live Birth Rate): rapporto tra i bambini nati e gli ET effettuati

Gli outcomes clinici sono stati definiti in accordo con il Consensus di Vienna (ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientist in Reproductive Medicine, 2017).

### 2.10 Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come Media  $\pm$  deviazione standard mentre le variabili categoriche sono state mostrate come frequenza e percentuale di incidenza.

Il confronto tra i gruppi è stato eseguito utilizzando il software SAS (SAS Institute, Cary, NC). Per l'analisi delle variabili categoriche è stato impiegato il chi quadro mentre per le variabili continue è stato usato il test t-Student o il Mann-Whitney test dopo verifica di normalità con test di Shapiro-Wilk.

In prima analisi è stato eseguito un modello di regressione logistica univariata; per eliminare ogni fattore confondente i dati sono poi stati corretti inserendo i dati clinici delle pazienti e rianalizzati in regressione logistica multivariata. I risultati sono stati riportati come OR (Odds Ratio) con un intervallo di confidenza del 95% (95% CI).

## Capitolo 3: Risultati

---

Sono stati osservati ed analizzati i trattamenti di 1542 coppie per un totale di 2373 embrioni valutati morfologicamente e trasferiti in utero. In 831 coppie è stato eseguito il trasferimento di due embrioni (DET) mentre in 711 è stato eseguito il trasferimento in utero di un solo embrione (SET).

Per ciascuna paziente sono stati registrati i seguenti parametri clinici ed i seguenti dati del trattamento: età, indice di massa corporea (BMI), dose di gonadotropine somministrate durante la stimolazione ovarica, responsività ovarica (OSI), FSH basale, causa di infertilità, numero di ovociti recuperati, numero di ovociti maturi, tipo di inseminazione, numero di ovociti fecondati, numero di ovociti clivati, numero di embrioni trasferiti, esito della gravidanza e, in caso di esito positivo, peso alla nascita del bambino (Tabella 2).

Dei 1542 trattamenti analizzati, il 32.9% (507 pazienti) ha ottenuto un esito positivo in seguito a dosaggio su sangue della gonadotropina corionica umana (hCG) ed in seguito ad ecografia transvaginale sono state confermate 453 gravidanze cliniche (29.4%). Complessivamente 312 pazienti (20.2%) hanno dato alla luce un bambino mentre 127 (28%) sono andate incontro ad un aborto. 12 pazienti sono ancora in corso di gravidanza mentre mancano i dati di due pazienti con test di gravidanza positivo in quanto perse al follow up (Tabella 3).

Per quanto riguarda il modello predittivo si può osservare come i dati siano in linea con quanto ipotizzato: considerando tutte le pazienti il dato atteso era del 28.1 % CPR e del 13.4% TR rispetto ad un dato reale del 29.4% CPR (+1.3 punti rispetto all'atteso) e del 14.1% TR (+0.7 punti rispetto all'atteso).

	<b>Pazienti</b> <i>n=1542</i>
<b>Età materna</b>	37.9 ± 4.2
<b>Dose totale FSH (IU)</b>	2564 ± 1268.1
<b>Dose Totale FSH_LH (IU)</b>	2758 ± 1337.2
<b>BMI</b>	21.5 ± 3.2
<b>FSH basale (IU)</b>	8.3 ± 3.4
<b>Sensibilità ovarica OSI</b>	3 ± 3
<b>N° ovociti recuperati</b>	5.9 ± 3.9
<b>N° ovociti in Metafase II</b>	4.7 ± 3.3
<b>N° ovociti fecondati</b>	3 ± 2.2
<b>N° ovociti clivati</b>	2.8 ± 2
<b>N° embrioni trasferiti</b>	1.5 ± 0,5
<b>Peso alla nascita</b>	2953,2 ± 606.6
<b>Causa di infertilità</b>	
<b>fattore femminile</b>	732 (47.5%)
<b>fattore maschile</b>	326 (21.1%)
<b>infertilità di coppia</b>	200 (13%)
<b>infertilità idiopatica</b>	259 (16.8%)
<b>altro</b>	25 (1.6%)
<b>Metodo di inseminazione</b>	
<b>IVF</b>	734 (47.6%)
<b>ICSI</b>	766 (49,7%)
<b>IVF e ICSI</b>	42 (2.7%)

**Tabela 2:** Caratteristiche cliniche delle pazienti e del ciclo di stimolazione ovarica. Le variabili categoriche sono indicate con numero e percentuale tra parentesi mentre le variabili continue sono indicate come media ± SD.

FSH=Follicle-stimulating-hormone; IU= International Units; BMI=Body Mass Index; OSI= Ovarian Sensitivity Index oo=oocytes; ET=Embryo Transfer IVF=In Vitro Fertilization; ICSI= Intracytoplasmic Sperm Injection

	<b>Pazienti</b> <i>n=1542</i>
<b>PR n(%)</b>	507 (32.9%)
<b>PR predetta %<sup>a</sup></b>	28,1%
<b>CPR n (%)</b>	453 (29.4%)
<b>LBR n(%)</b>	312 (20.2%)
<b>TR n(%)</b>	64 (4.1%)
<b>TR predetta %<sup>a</sup></b>	13,4%
<b>MR n(%)</b>	127 (28.0%)
<b>IR %</b>	21,8%

**Tabella 3.** Outcomes dei 1542 trattamenti analizzati.

PR= Pregnancy Rate, CPR= Clinical Pregnancy Rate, LBR= Live Birth Rate; TR= Twin rate;; MR= Miscarriage Rate; IR= Implantation Rate

<sup>a</sup>= prediction model

### 3.1 Analisi dei Cinque gruppi di studio

Dopo un'analisi generale, le pazienti sono state suddivise in cinque gruppi di studio in base alla qualità degli embrioni trasferiti. In 639 pazienti è stato eseguito il trasferimento di un singolo embrione di buona qualità (gruppo 1 – G), in 72 pazienti è stato trasferito sempre un solo embrione ma di scarsa qualità morfologica (gruppo 2 – B), in 691 sono stati trasferiti due embrioni di buona qualità (gruppo 3 – G+G), in 119 pazienti sono invece stati trasferiti due embrioni con score morfologico opposto (gruppo 4 – G+B) e infine in 21 pazienti sono stati trasferiti due embrioni di scarsa qualità (gruppo 5 – B+B).

Nella Tabella 4 sono indicate le caratteristiche cliniche delle pazienti suddivise in base al gruppo di appartenenza. Nella Tabella 5, invece sono indicati e confrontati tra loro i diversi outcomes dei trattamenti.

	<b>Gruppo 1 (set G) n=639</b>	<b>Gruppo 2 (set B) n=72</b>	<b>Gruppo 3 (G+G) n=691</b>	<b>Gruppo 4 (G+B) n=119</b>	<b>Gruppo 5 (B+B) n=21</b>
<b>Età materna</b>	37.7 ± 4.5	37.6 ± 3.8	37.8 ± 3.9	38.7 ± 4	38.7 ± 3.1
<b>Dose totale FSH (IU)</b>	2416,4 ± 1374.3	2427.6 ± 1583,4	2621.0 ± 1108.5	2992.9 ± 1251.8	3003.6 ± 1239.1
<b>Dose Totale FSH_LH (IU)</b>	2635.4 ± 1427.5	2708 ± 1745.6	2773.3 ± 1171.2	3239.3 ± 1352.8	3260.7 ± 1497.1
<b>BMI</b>	21.7 ± 3.2	21,4 ± 3,2	21.5 ± 3.1	21.3 ± 3	22.1 ± 4.2
<b>FSH basale (IU)</b>	8.6 ± 3.7	8.7 ± 3.5	8 ± 3	9.1 ± 3.5	8.9 ± 3.4
<b>Sensitività ovarica OSI</b>	2.8 ± 3.1	2.2 ± 2.2	3.4 ± 3.1	2.3 ± 2	2.4 ± 2
<b>N° ovociti recuperati</b>	4.7 ± 3.9	3.7 ± 2.6	7.2 ± 3.7	5.7 ± 2.9	5.9 ± 2.3
<b>N° ovociti in Metafase II</b>	3.7 ± 3.1	2.5 ± 1.8	6 ± 3.1	4.6 v2.4	4.5 ± 2.3
<b>N° ovociti fecondati</b>	2.1 ± 2.0	1.4 ± 1	4 ± 2	2.7 ± 1.6	2.7 ± 1.6
<b>N° ovociti clivati</b>	2.0 ± 1,9	1.2 ± 0.8	3.8 ± 1.8	2.5 v1.3	2.2 ± 0.3
<b>N° embrioni trasferiti</b>	1	1	2	2	2
<b>Peso alla nascita</b>	3151,5 ± 435	3089.2 ± 598.6	2852.9 ± 645.6	2954.1 ± 698.6	3295 ± 275 8
<b>Causa di infertilità</b>					
<b>fattore femminile</b>	345 (54%)	10 (13,8%)	332 (48%)	38 (31,9%)	7 (33,3%)
<b>fattore maschile</b>	149 (23,3%)	16 (22,2%)	135 (19,5%)	20 (16,8%)	6 (28,6%)
<b>infertilità di coppia</b>	56 (8,7%)	12 (16,7%)	90 (13%)	34 (28,6%)	8 (38,1%)
<b>infertilità idiopatica</b>	83 (13%)	31 (43,1%)	122 (17,7%)	23 (19,4%)	0
<b>altro</b>	6 (1%)	3 (4,2%)	12 (1,8%)	4 (3,3%)	0
<b>Metodo di inseminazione</b>					
<b>IVF</b>	398 (54.2%)	46 (6,3%)	243 (33.1%)	40 (5.4%)	7 (1%)
<b>ICSI</b>	229 (29.9%)	26 (3.4%)	419 (54.7%)	78 (10.2%)	14 (1.8%)
<b>IVF e ICSI</b>	12 (28.6%)	0	29 (69%)	1 (2.4%)	0

**Tabella 4.** Caratteristiche cliniche delle pazienti e del ciclo di stimolazione ovarica suddivise nei cinque gruppi di studio. Le variabili categoriche sono indicate con numero e percentuale tra parentesi mentre le variabili continue sono indicate come media ± SD.

	<b>Gruppo 1 (set G) n=639</b>	<b>Gruppo 2 (set B) n=72</b>	<b>Gruppo 3 (G+G) n=691</b>	<b>Gruppo 4 (G+B) n=119</b>	<b>Gruppo 5 (B+B) n=21</b>	<b>p value</b>
PR n(%)	163 (25.5%)	7 (9.7%)	298 (43.1%)	37 (31.1%)	2 (9.5%)	< 0.0001
CPR n (%) CPR predetta % <sup>a</sup>	143 (22.4%) 26.1%	7 (9.7%) 11.1%	268 (38.7%) 34.1%	33 (27.7%) 18.0%	2 (9.5%) 9.2%	< 0.0001
LBR n(%)	89 (13.9%)	6 (8.3%)	193 (27.9%)	22 (18.5%)	2 (9.5%)	< 0.0001
TR n(%) TR predetta % <sup>a</sup>	– –	– –	59 (22 %) 17.1%	5 (15.1%) 6.3%	0 2.8%	< 0.0001
MR n(%)	51 (35.7%)	1 (14.3%)	66 (24.6%)	9 (27.3%)	0	n.s.
IR %	22.3%	9.7%	23.6%	15.9%	4.7%	< 0.0001

**Tabella 5 .** Outcomes dei cinque gruppi di studio.

PR= Pregnancy Rate, CPR= Clinical Pregnancy Rate, LBR= Live Birth Rate; TR= Twin rate;; MR= Miscarriage Rate; IR= Implantation Rate

<sup>a</sup>= prediction model dei gruppi di studio suddivisi in base alla qualità degli embrioni trasferiti in utero.

P < 0.0001: esiste una differenza statisticamente significativa.

L'outcome dei diversi gruppi è visibile nella Tabella 5. Per quanto riguarda l'IR %, la PR%, la CPR% e la LBR% si osserva come le pazienti che trasferiscono due embrioni di buona qualità presentino una maggior probabilità di successo rispetto agli altri gruppi avendo una probabilità del 43.1 % di ottenere un esito positivo, una probabilità del 38.7% di ottenere una gravidanza clinica ed una probabilità del 27.9% di portare a termine la gravidanza.

A seguire troviamo il gruppo 4 ed il gruppo 1 ed infine il gruppo 2 ed il gruppo 5 di pazienti che hanno trasferito solamente embrioni di scarsa qualità che presentano una probabilità di successo più bassa rispetto agli altri gruppi di studio.

Per quanto riguarda la probabilità di ottenere una gravidanza gemellare (TR%), nel gruppo 5 non si sono instaurate gravidanze gemellari mentre si osserva una

probabilità del 22.5% nel gruppo 3 ed una probabilità del 15.1% nel gruppo 4: dati apparentemente sovrapponibili nonostante il diverso score morfologico degli embrioni trasferiti.

In tabella 5 sono indicati anche i dati relativi alla probabilità di gravidanza sia singola (PR Predicted%) sia gemellare (TR Predicted%) generati dal modello predittivo a disposizione nella clinica (Linnefiler). Notiamo come per quasi tutti i gruppi analizzati il modello predittivo è in linea con i dati ottenuti e rispecchia lo stesso trend dei dati reali. Solamente nel gruppo 4 il modello predittivo si discosta dal dato reale di circa 10 punti in negativo sia per la probabilità di gravidanza clinica che per la probabilità di gravidanza gemellare. Sembrerebbe pertanto sottostimare la realtà, probabilmente per l'attribuzione di maggior peso alla scarsa qualità morfologica del secondo embrione trasferito.

Infine, per un'analisi più approfondita e per capire qual sia la reale associazione tra gli outcomes analizzati e i nostri gruppi di studio è stata eseguita un'analisi logistica univariata seguita da un'analisi di regressione multivariata. Per eliminare potenziali "bias" ed uniformare i gruppi di studio analizzati, i dati sono stati corretti inserendo anche i parametri clinici delle pazienti appartenenti ai gruppi di studio.

Per capire realmente se il trasferimento di un embrione di scarsa qualità associato ad uno di buona qualità possa in qualche modo influenzare l'outcome del trattamento (in termini di %PR, %LBR, %TR, %MR), si è deciso di assumere come gruppo di controllo il gruppo 1 composto da pazienti che hanno trasferito in utero un singolo embrione di buona qualità, sia in modo elettivo che non, e confrontarlo con i gruppi 3 e 4.

I dati ottenuti sono mostrati nella Tabella 6.

	<b>3 (G+G) vs 1 (G)</b> <i>n=691</i> OR (IC 95%)	OR Adj (IC 95%)	<b>4(G+B) vs 1 (G)</b> <i>n=119</i> OR (IC 95%)	OR Adj (IC 95%)
<b>PR n(%)</b>	2.214 (1.754; 2.795) <sup>a</sup>	1.762 (1.312; 2.365) <sup>a</sup>	1.318 (0.860;2.019)	1.956 (1.212; 3.156) <sup>a</sup>
<b>LBR n(%)</b>	2.395 (1.812; 3.165) <sup>a</sup>	1.937 (1.378; 2.723) <sup>a</sup>	1.402 (0.838; 2.344)	2.134 (1.204; 3.782) <sup>a</sup>
<b>TR n(%)</b>	3,052 (1.884; 4.943) <sup>a</sup>	3.925 (2.257; 6.827) <sup>a</sup>	2,091 (0.878; 4.976)	2,518 (1.010; 6.281) <sup>a</sup>
<b>MR n(%)</b>	0.589 (0.379; 0.916)	0.707 (0.410; 1.216)	0.676 (0.292; 1.565)	0.584 (0.233; 1.463)

**Tabella 6** Regressione logistica univariata e multivariata.

OR = Odds Ratio; OR Adj= Odds ratios Adjusted

Adj= adjusted for maternal age, total dose FSH, total dose FSH\_LH, body mass index, baseline FSH, OSI, number of oocytes retrieved, number of MII, number of fertilized, number of cleaved, number of embryos ET, birth weight, insemination method and type of infertility.

<sup>a</sup> = differenze significativi

Gruppo 3 (G+G) VS Gruppo 1 (G): con l'analisi univariata di regressione logistica si osserva una differenza significativa in tutti gli outcomes analizzati tranne che per la probabilità di aborto, che già nelle analisi precedenti non era risultata significativo. Analizzando i dati e correggendoli in multivariata le differenze tra i due gruppi rimangono significative. Per quanto riguarda la probabilità di gravidanza (PR%) si osserva infatti un OR di 1.76: nelle pazienti che trasferiscono due embrioni di buona qualità si osserva quindi una probabilità quasi due volte maggiore di ottenere un esito positivo rispetto alle pazienti in cui viene trasferito un solo embrione di buona qualità. Stesso andamento si osserva anche per la LBR% (OR dell'1.93).

Come ci si poteva aspettare anche la probabilità di ottenere una gravidanza gemellare è significativamente diversa tra i due gruppi e le pazienti che trasferiscono due embrioni presentano un OR = 3.92 di incorrere in una gravidanza gemellare.

#### Gruppo 4 (G+B) VS Gruppo 1 (G).

Il confronto tra questi due gruppi di studio ha dato risultati interessanti: in una prima analisi univariata non si osservano infatti differenze significative tra i due gruppi ma, correggendo i dati inserendo le caratteristiche delle pazienti incluse nei due gruppi, sia la PR%, sia la LBR% che la TR% diventano significative. Come nel confronto con il gruppo 3 anche qui si osserva un aumento quasi del doppio sia della possibilità di ottenere un esito positivo, sia della possibilità di portare a termine una gravidanza nelle pazienti che trasferiscono due embrioni, anche se di score opposto, rispetto a quelle che ne trasferiscono uno solo di buona qualità (PR %: OR di 1.95; LBR% OR di 2.13).

Stesso discorso anche per la probabilità di gravidanza gemellare che quindi sussiste indipendentemente dalla qualità morfologica del secondo embrione trasferito (OR di 2.51 MR).

## Capitolo 4: Discussione

---

La qualità embrionaria è da sempre considerata uno dei principali fattori in grado di influenzare l'esito di un trattamento di Fecondazione in Vitro (Oron G 2014, Zhu J et al 2014). Ad oggi nella maggiore parte dei laboratori di PMA gli embrioni vengono ancora valutati e selezionati dal punto di vista morfologico, pertanto la selezione del o degli embrioni da trasferire è e rimane uno dei punti fondamentale per la buona riuscita di un trattamento di Fecondazione in Vitro.

Molti studi in letteratura hanno dimostrato una forte associazione tra gli aspetti morfologici dell'embrione e le percentuali di impianto e di gravidanza evolutiva (Oron G. ET AL 2014; Ziebe S et al 1997). Un embrione di buona qualità dal punto di vista morfologico ha maggiori probabilità di impiantarsi in utero e di instaurare una gravidanza rispetto ad uno di scarsa qualità (Giorgetti G 1995; Ziebe S 1997). Tuttavia, nei trattamenti di Fecondazione in Vitro non è possibile garantire alle pazienti l'ottenimento di embrioni di buona qualità perciò come comportarsi di fronte ad embrioni con morfologia mediocre? In particolare, nelle pazienti destinate a DET in cui si osserva la presenza di due embrioni con score morfologico opposto, il quesito che ci si pone è se il trasferimento dell'embrione di scarsa qualità possa in qualche modo influenzare l'outcome del trattamento.

Dai dati analizzati nel nostro studio si osserva una differenza significativa sia tra il gruppo 3 (G+G) ed il gruppo 1 (G), che tra il gruppo 4 (G+B) ed il gruppo 1 (G). Nel primo confronto il dato era atteso e non stupisce particolarmente osservando anche un'elevata probabilità di gravidanza gemellare nel gruppo 3 (22%). Nel secondo confronto, invece, le pazienti che hanno trasferito in utero due embrioni di score opposto presentano probabilità quasi due volte maggiori di ottenere un esito positivo (PR%-LBR%) rispetto a quelle in cui è stato trasferito solamente un embrione di buona qualità. Dai dati in nostro possesso sembrerebbe, quindi, che il trasferimento di un embrione di scarsa qualità associato ad uno di buona qualità non alteri la probabilità di successo del trattamento. L'embrione con morfologia peggiore non solo non influenza in modo negativo l'impianto in utero, né sembra avere un'influenza negativa sull'embrione di buona qualità, ma, al contrario, sembrerebbe addirittura sinergizzare con l'altro embrione aumentando sia le proprie chances di impianto che quelle dell'embrione di buona qualità. A

dimostrazione di quanto affermato, nel gruppo 4 si osserva il 15.1% di gravidanze gemellari e si riscontra una maggior probabilità di gravidanza rispetto al gruppo 1 in cui viene trasferito un solo embrione di buona qualità.

Quanto osservato sarebbe un'ulteriore conferma dell'effetto benefico che gli embrioni hanno interagendo tra loro. E' infatti nota in letteratura un'interazione di tipo cooperativo tra gli embrioni tenuti in coltura insieme; questa cooperazione è mediata da fattori di crescita e fattori trofici secreti dagli stessi embrioni che agiscono sia in modo autocrino che paracrino, promuovendo e sostenendo lo sviluppo embrionario (Paria B.C. et al 1990). L'effetto autocrino e paracrino dei fattori secreti dagli embrioni è stato ampiamente documentato anche nella specie animale. Già negli anni '90, infatti, sono stati pubblicati studi a sostegno della coltura di gruppo di embrioni sia di topo che di bovino mostrando un aumento dello sviluppo embrionale fino allo stadio di blastocisti. Allo stesso tempo è stato dimostrato come embrioni tenuti in coltura singola mostrassero una minor espressione e rilascio di fattori di crescita a differenza di quelli tenuti in coltura di gruppo diminuendo così le chances di sviluppo fino allo stadio di blastocisti non supportando le successive fasi di sviluppo cellulare (Lane and Gardner 1992, Stojanovic et al 1996, O' Doherty et al 1997, Gopichandran et al 2006). Successivamente, anche gli studi su embrioni umani hanno confermato come embrioni tenuti in coltura di gruppo presentino maggiori probabilità di raggiungere lo stadio di blastocisti rispetto agli embrioni tenuti in coltura singolarmente. Inoltre, per questi embrioni si osserva anche una maggiore probabilità di impianto e di gravidanza clinica (Ebner et al 2010; Tao et al 2003; Reed et al 2011; Lazaro et al 2010; Gardner DK et al 2017). Tra i fattori secreti dagli embrioni, di particolare interesse sembrano essere l'IGF I (Insulin-like Growth factor I), IGF II (Insulin-like Growth factor II) e il fattore attivante le piastrine (PAF: Platelet-activating factor) (O'Neill et al 2008; Spanos et al 2000; Stojanovic et al 1999). Quest'ultimo in particolare, legandosi ai suoi recettori di membrana, è mediatore di una vasta gamma di funzioni biologiche volte proprio a promuovere la sopravvivenza dell'embrione come ad esempio la riduzione dell'apoptosi, promuovendo contemporaneamente la mitosi cellulare necessaria all'embrione nelle prime fasi di sviluppo cellulare (O'Neill et al 1997-1998; Roberts et al 1993; Lu et al 2003 ).

Dai dati osservati nel nostro studio sembrerebbe quindi che, nelle pazienti destinate a DET, i due embrioni trasferiti, sia che siano di qualità morfologica concordante, sia che presentino qualità opposte, continuano a cooperare tra loro anche *in vivo* promuovendo le successive fasi di sviluppo cellulare e presentino, infatti, maggiori probabilità di impianto e di gravidanza rispetto al trasferimento di un singolo embrione di buona qualità morfologica.

A supporto di quanto osservato potrebbero anche essere coinvolti i meccanismi di auto correzione di fattori morfologici negativi messi in atto dagli embrioni di scarsa qualità. Ad esempio, in letteratura è noto come allo stadio di 2 cellule si osservi un'elevata percentuale di embrioni multinucleati, percentuale che si riduce drasticamente allo stadio di 4 cellule e ulteriormente al terzo giorno di sviluppo. Balakier e collaboratori hanno, inoltre, osservato come il 56,8% degli embrioni multinucleati allo stadio di 2 cellule si sviluppi in blastocisti di buona qualità e che di queste circa il 50% risulti euploide in seguito a screening genetico preimpianto, sostenendo quindi una tesi a favore della presenza di un meccanismo di auto correzione (Balakier et al 2016). Lo score morfologico impiegato in questo studio, ICM (Holte et al 2007), tiene conto di tre principali parametri morfologici tra cui proprio la velocità di clivaggio e la presenza di blastomeri multinucleati; pertanto ad esempio un embrione che in Day 2 presenta 2 cellule di cui almeno una multinucleata è stato definito *Bad* avendo uno score ICM < 5. Nel gruppo 4, è possibile quindi che la qualità di alcuni embrioni definiti *Bad* sia stata sottovalutata e che in realtà, gli stessi embrioni se osservati in Day 3 o anche solo a distanza di qualche ora, sarebbero invece rientrati nella categoria *Good* o che comunque siano in grado di auto-correggersi *in vivo* nelle successive fasi di sviluppo aumentando le probabilità di gravidanza delle pazienti.

Rispondendo, quindi, alla domanda iniziale se il trasferimento in seconda giornata di un embrione di scarsa qualità morfologica in associazione ad uno di buona qualità possa influenzare in modo negativo l'outcome del trattamento, la risposta in base ai dati in nostro possesso è di segno opposto; al contrario, sembra poterlo addirittura influenzare in modo positivo.

In letteratura sono presenti due studi condotti dal gruppo di Wintner E. e da Jiaheng Li e collaboratori, entrambi studi retrospettivi, in cui sono rispettivamente stati analizzati ed osservati gli esiti di 603 e 1646 trattamenti di IVF. In entrambi

gli studi è stato concluso che nei DET con trasferimento di embrioni con score discordante, l'embrione di qualità morfologica più scadente non influenza in modo negativo quello di buona qualità.

Tre ulteriori metanalisi (McLernon DJ 2010; Baruffi RL 2009; Gelbaya TA 2010) sono d'accordo nell'affermare che si osserva una maggiore probabilità di gravidanza clinica nelle pazienti in cui si decida di trasferire due embrioni, nella maggior parte dei trattamenti analizzati embrioni con score discordante, rispetto a quelle in cui si sia deciso di trasferire un solo embrione di buona qualità morfologica. E' anche vero, però, che nella metanalisi di McLernon, valutando la probabilità di gravidanza cumulativa del gruppo di pazienti destinate al trasferimento di un solo embrione, il confronto con il gruppo di pazienti DET non era più differente e i risultati erano confrontabili tra loro, a parte l'ovvia presenza di una probabilità di gravidanza gemellare quasi nulla nel gruppo SET.

Se quindi è vero che da un lato le pazienti che trasferiscono due embrioni in seconda giornata di sviluppo cellulare, indipendentemente dalla diversa qualità morfologica, presentano maggiori probabilità di successo rispetto a quelle che trasferiscono un solo embrione di buona qualità, dall'altro lato bisogna tenere in considerazione l'aumentata probabilità di ottenere una gravidanza gemellare, con i rischi che essa comporta (Thurin A 2004; Martikainen H 2001).

Per un'ulteriore conferma di quanto emerso dai nostri dati sarebbe quindi opportuno integrare l'analisi confrontando anche le probabilità di gravidanza cumulativa tra i diversi gruppi, in tal caso si potrebbe valutare il reale andamento delle pazienti che trasferiscono un solo embrione di buona qualità.

E' inoltre opportuno sottolineare come nel gruppo 1 la maggior parte delle pazienti, 458 su 639, abbia trasferito un solo embrione di buona qualità in quanto unico disponibile (SET), mentre per le restanti 181 si sia optato per il trasferimento elettivo di un solo embrione (eSET). Come da atteso, le pazienti di quest'ultimo gruppo presentano una buona prognosi e si osserva infatti una probabilità di gravidanza del 36,5% vs 12,5% delle pazienti che hanno trasferito un solo embrione di buona qualità non elettivo (dati non mostrati). Da questi dati si può evincere come, indipendentemente dalla qualità morfologica dell'embrione trasferito, la prognosi e la storia clinica delle pazienti influenzano in modo cruciale l'esito di un trattamento.

Data la natura retrospettiva del nostro studio, per un ulteriore approfondimento varrebbe quindi la pena eseguire uno studio prospettico randomizzato includendo nell'analisi anche i dati della probabilità di gravidanza cumulativa.

In letteratura sono comunque presenti anche dati contrastanti rispetto a quelli osservati nel nostro studio, nel 2016 El-Danasouri e collaboratori hanno infatti pubblicato uno studio retrospettivo analizzando 761 trattamenti e affermando l'influenza negativa dell'embrione con morfologia alterata; nel 2018 anche Dobson e collaboratori, considerando 1009 cicli, concludono non supportando il trasferimento di un embrione di scarsa qualità in associazione ad uno top score. E' anche vero, però, che nel primo studio sono stati analizzati solamente i dati relativi alla probabilità di gravidanza e all'impianto degli embrioni, mentre nel secondo studio dai dati non emerge una reale differenza significativa tra le pazienti che trasferiscono due embrioni con score discordante e quelle che ne trasferiscono solamente uno di score elevato.

E' importante, però, considerare come in letteratura ci siano alcuni studi a sostegno della qualità degli embrioni definiti di cattiva qualità morfologica in seconda/terza giornata di sviluppo. Come emerso anche dai nostri dati, questa categoria di embrioni è in grado di raggiungere lo stadio di blastocisti e di impiantarsi in utero portando alla nascita di bambini sani. Questi embrioni presentano sì una minor probabilità di raggiungere lo stadio di sviluppo avanzato in quinta giornata rispetto agli embrioni definiti di buona qualità morfologica, ma il loro impiego può influenzare in modo positivo gli outcomes dei trattamenti di Fecondazione in Vitro (Kaartinen N et al 2015; Poulain M et al 2014). Infatti, come osservato da Sallem e collaboratori, non si osservano differenze significative di gravidanza clinica tra i trattamenti in cui è stata trasferita a fresco una blastocisti derivante da un embrione di buona qualità morfologica in seconda giornata e i trattamenti in cui è stata trasferita una blastocisti scongelata derivante da un embrione di scarsa qualità.

Anche per quanto riguarda gli outcomes ostetrici e neonatali, vari studi affermano che il trasferimento di un embrione di scarsa qualità morfologica non aumenta il rischio di complicazioni né durante la gravidanza, né per la salute del nascituro, presentando lo stesso decorso clinico che si osserva in seguito al trasferimento in

utero di embrioni di buona qualità morfologica (Oron G et al 2014;Kozue A et al 2018; Zhu J et al 2014; Nakagawa K et al 2016).

In conclusione possiamo affermare che lo score morfologico degli embrioni in seconda giornata di sviluppo non riflette necessariamente il potenziale di sviluppo e di impianto dell'embrione (Guerif F et al 2010; Alikani M et al 2000; Szekeres-Bartho J et al 2016). Nonostante ciò, nella maggior parte dei laboratori di Fecondazione in Vitro l'analisi morfologica degli embrioni, pur essendo un metodo soggettivo e operatore-dipendente, resta ancora l'unico metodo di selezione degli embrioni. L'ESHRE ha cercato di rendere meno soggettiva l'analisi morfologica proponendo sia una consensus pubblicata nel 2011 per uniformare i vari laboratori che un atlante di embriologia pubblicato nel 2000 e revisionato nel 2016, ma anche in questo caso, però, sono seguite molte critiche soprattutto per quanto riguarda la definizione di embrioni di cattiva qualità.

Inoltre, da quando è disponibile lo screening genetico pre-impianto (PGT-A Preimplantation Genetic Test for Aneuploidy) degli embrioni, l'analisi morfologica sta perdendo il suo valore predittivo. Infatti, se da un lato i metodi di osservazione basati sull'analisi morfologica offrono il vantaggio di non essere invasivi dall'altro non danno alcuna informazione riguardo l'assetto cromosomico degli embrioni in questione. La PGT-A permette, invece, di identificare la presenza di alterazioni cromosomiche in fasi molto precoci dello sviluppo embrionale, anche prima che si instauri la gravidanza. Grazie all'introduzione della PGT-A nella pratica clinica è ed è stato possibile migliorare gli outcomes riproduttivi delle coppie infertili e l'efficienza dei trattamenti di fecondazione in Vitro, ridurre il tasso di aborto, minimizzare l'incidenza di gravidanze con feti affetti da anomalie cromosomiche, incrementare il tasso di gravidanza a termine per trasferimento embrionale e soprattutto ridurre i tempi che una coppia investe per raggiungere una gravidanza a termine. I dati presenti in letteratura inoltre sono unanimi nell'affermare che l'assetto cromosomico degli embrioni non correla con la morfologia dell'embrione in nessuno stadio di sviluppo, e a parità di qualità morfologica l'embrione con assetto cromosomico euploide presenta ovviamente maggiori probabilità di successo. (Voullaire L et al 2007; Alfarawati S et al 2011; Mertzanidou A et al 2013, Fragouli E et al 2014; Capalbo A et al 2014; Gardner K et al 2016; Vinals Gonzalez X et al 2019).

Ad oggi sono disponibili anche altri metodi non invasivi di selezione degli embrioni, come ad esempio l'analisi morfocinetica grazie all'impiego della tecnologia time-lapse e l'analisi proteomica e metabolomica. Valutando i dati presenti in letteratura si nota come, anche in questo caso, la morfologia degli embrioni non correla con la morfocinetica né rifletta la reale fisiologia dell'embrione (Hardy et al 1990; Gardner et al 2001,2011;2016 Katz-Jaffe et al 2006; Dominguez et al 2015, Sallem A et al 2018).

In conclusione, ad oggi il mondo scientifico è ancora alla ricerca di un metodo ideale e standardizzato per la selezione degli embrioni da trasferire. Al momento, nella maggior parte dei laboratori di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA), in assenza di screening genetico preimpianto, la valutazione morfologica può essere impiegata in associazione alla coltura prolungata degli embrioni tenendo comunque bene a mente il potenziale di sviluppo e di impianto degli embrioni definiti di scarsa qualità morfologica.

## Capitolo 5: Conclusione

---

Ad oggi la comunità scientifica sta applicando sempre più il trasferimento di un singolo embrione per ridurre al minimo i rischi di gravidanza gemellare e delle sue complicazioni, ma sono ancora numerosi i Centri che decidono di trasferire due embrioni in seconda o terza giornata di sviluppo. Dai dati analizzati in questo studio emerge come, in seguito ad analisi morfologica in seconda giornata di sviluppo, nelle pazienti destinate a DET l'associazione di un embrione definito di scarsa qualità con uno di buona qualità non influenza in modo negativo gli esiti del trattamento di PMA, ma anzi sembrerebbe addirittura aumentare le probabilità di successo.

Emerge, quindi, una tesi a conferma dell'esistenza sia di un'interazione di tipo cooperativo tra gli embrioni sia dell'esistenza di meccanismi di auto-correzione, a favore del transfer in utero anche degli embrioni di scarsa qualità morfologica, rimettendo in discussione il reale valore predittivo dell'analisi morfologica nella selezione degli embrioni.

E' comunque opportuno considerare che la natura del nostro studio è di tipo retrospettivo, pertanto per confermare quanto osservato sarebbe auspicabile ampliare l'analisi con uno studio prospettico randomizzato, includendo come ulteriore braccio di analisi il trasferimento di singola blastocisti, in modo da avere una visione più informativa.

## 6 - Bibliografia

---

- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutierrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Wells D.: The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 95:520-524, 2011.
- Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 2000;15: 2634–43.
- Alikani M.: The origins and consequences of fragmentation in mammalian eggs and embryos. Elder K, Cohen J (Eds). *Human preimplantation embryo selection. London: Informa Healthcare* 51-57, 2007.
- Alpha Scientists in Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online.* 2011 Jun 1;22(6):632–46.
- Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. Cochrane Gynaecology and Fertility Group, editor. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2018 May 25.
- Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Librach C The impact of multinucleated blastomeres on embryo developmental competence, morphokinetics, and aneuploidy. *Fertility and Sterility* May 2016.
- Baruffi R; Mauri AL, Peterson CG; Nicoletti A, Pontes A, Oliveira JB et al Single-embryo transfer reduces clinical pregnancy rates and live births in fresh IVF and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:36
- Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M.: Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* CD002118, 2007.
- Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod.* 2014;29(6):1173– 81.

- Castelló D, Motato Y, Basile N, et al. How much have we learned from time-lapse in clinical IVF? *Mol Hum Reprod* 2016;22(10):719-27.
- Dobson Samuel James Alexander, B.M., Lao Maria Teresita, Essam Michael, M.D.,b Alex C. Varghese, Ph.D.,b and Kannamannadiar Jayaprakasan, Ph.D.a,c Effect of transfer of a poor quality embryo along with a top quality embryo on the outcome during fresh and frozen in vitro fertilization cycles *Fertility and Sterility*® Vol. 110, No. 4, September 2018.
- Dominguez F, Meseguer M, Aparicio-Ruiz B, Piqueras P, Quinonero A, Simon C. New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies. *Fertil Steril* 2015; 104:908–914.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003;9:251-262.
- Ebner T, O Shebl , M Moser, RB Mayer, W Arzt b, G Tews Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth *Reproductive BioMedicine Online* (2010) 21, 762– 768
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 1980;87:737–756.
- El-Danasouri I, Sterzik K, Rinaldi L, Pacchiarotti A, DeSanto M, Selman H. Effect of transferring a morphologically impaired embryo with a good quality embryo on the pregnancy and implantation rates *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 016;20(3):394-8.
- ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reprod BioMed Online.* 2017;35(5):494– 510.- Fisch JD, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2001;16:1970-1975.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002;17:407-412.
- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol Hum Reprod* 2014;20:117–126.

- Gardner DK, Schoolcraft WB,: In Vitro Culture of Human Blastocyst. Jansen R, Mortimer D, (Eds.): Towards Reproductive Certainty Infertility and Genetics Beyond 1999, London 1999 Parthenon Publishing 377-388.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001;76:1175–1180.
- Gardner DK, Wale PL, Collins R, Lane M. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod* 2011;26:1981–1986.
- Gardner DK. and Balaban Basak Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and ‘OMICS’: is looking good still important? *Molecular Human Reproduction*, Vol.22, No.10 pp. 704–718, 2016
- Gardner DK and Kelley RI Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2017 1-18
- Gelbaya TA, Tsoumpou J, Nardo LG, The likelihood of live birth and multiple birth after single versus double embryo transfer at the cleavage stage: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2010; 94:936-45
- Giorgetti C, et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Human Reprod.* 1995;10: 2427–31.
- Gonzalez X.V, Odial R, Naja R., Serhal P. , Saab W, Seshadri S. , Nagi J. Euploid blastocysts implant irrespective of their morphology after NGS-(PGT-A) testing in advanced maternal age patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* May 2019.
- Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2016 Feb 1;105(2):275-285.e10.
- Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, Royere D.: Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict

blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod* 22:1973-1981, 2007.

- Guerif F, Lemseffer M, Leger J, Bidault R, Cadoret V, Chavez C, et al. Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer? *Reprod BioMed Online*. 2010;21:510–9.

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

- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990;5:708–714.

- Hertig AT, Rock J, Adams EC, Mulligan WJ. On the preimplantation stages of the human ovum—a description of four normal and four abnormal specimens ranging from the second to the fifth day of development. *Contrib Embryol Carnegie Instn* 1954;35:199–220.

- Holte J, Berglund L, Milton K, Garello C, Gennarelli G, Revelli A, et al. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on Day 2 after oocyte retrieval. *Hum Reprod*. 2007 Feb 1;22(2):548–57.

- Hunault CC, Eijkemans MJ, Pieters MH, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC and Macklon NS (2002) A prediction model for selecting patients undergoing in vitro fertilization for elective single embryo transfer. *Fertil Steril* 77,725–732.

- Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1998;70:60–66.

- Jiaheng Li<sup>1</sup> †, Mingze Du<sup>1</sup> †, Zhan Zhang<sup>1</sup>\*, Yichun Guan<sup>1</sup>, Xingling Wang<sup>1</sup>, Xiao Zhang<sup>2</sup>, Jing Liu<sup>1</sup>, Zhouhui Pan<sup>1</sup>, Bijun Wang<sup>1</sup> and Wenxia Liu<sup>1</sup> “Does a poor-quality embryo have an adverse impact on a good-quality embryo when transferred together?” Li et al. *Journal of Ovarian Research* (2018)

- Johansson M, Hardarson T, Lundin K.: There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *J Assist Reprod Genet.* 20: 309–13, 2003.
- Kaartinen N, Das P, Kananen K, Huhtala H, Tinkanen H. Can repeated IVF-ICSI-cycles be avoided by using blastocysts developing from poor-quality cleavage stage embryos? *Reprod BioMed Online.* 2015;30:241–7
- Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2014 Sep 1;20(5):617–31.
- Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril* 2006;85:101–107.
- Kirkegaard K, Agerholm I, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod* 2012;27:1277-1285.
- Kirkegaard K, Ahlström A, Ingerslev HJ, Hardarson T. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil Steril.* 2015 Feb;103(2):323–32
- Kligman I, Benavida C, Alikani M, Munne S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 1996;11:1492–1498.
- Kovacs P. Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014 Dec 15;12(1):124.
- Kozue Akamine, Keiko Mekarui, Keiya Gibo, Chinatsu Nagata, Sugiko Oishi, Maho Miyagi, Chiaki Heshiki, Tadatugu Kinjo, Hitoshi Masamoto, Yoichi Aoki Comparative study of obstetric and neonatal outcomes of live births between poor- and good-quality embryo transfers *Reprod Med Biol.* 2018;17:188–194.
- Lazaro I. R; Phillip M. The culture of human cleavage stage embryos alone or in groups: effect upon blastocyst utilization rates and implantation *Reproductive Biology* 2010; volume 10 n°3.

- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;17:385-391.
- Liu Y, Chapple V, Roberts P, Matson P. Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *Fertility and Sterility* (2014); 102 (5): 1295-1300
- Lu, D.P., Chandrakanthan, V., Cahana, A., et al., 2003. Trophic signals acting via phosphatidylinositol-3-kinase are required for normal pre-implantation mouse embryo development. *J. Cell Sci.* 117, 1567–1576.
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;16:2652-2657.
- Martikainen H, Tiitinen A, Tomas C, Tapanainen J, Orava M, Tuomivaara L, et al. One versus two embryo transfer after IVF and ICSI: a randomized study. *Hum Reprod* 2001;16:1900–3.
- Mertzaniidou A, Wilton L, Cheng J, Spits C, Vanneste E, Moreau Y, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 2013;28:256–64.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;26:2658-2671.
- McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neubourg D, Dumoulin JC et al Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer:meta-analysis of individual patient data from randomized trials. *Br Med J* 2010; 341:C6945
- Nakagawa K, Ojira Y, Nishi Y, Sugiyama R, Motoyama H, Sugiyama R. Perinatal outcomes of patients who achieved pregnancy with a morphologically poor embryo via assisted reproductive technology. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293:183-188.

- O'Neill, C., 1997. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol. Reprod.* 56, 229–237.
- O'Neill, C., 1998. Role of autocrine mediators in the regulation of embryo viability: lessons from animal models. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15, 460–465.
- O'Neill, C., 2008. The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development. *Hum. Reprod. Update* 14, 275–288.
- Omid M, Faramarzi A, Agharahimi A, Khalili MA. Noninvasive imaging systems for gametes and embryo selection in IVF programs: a review. *J Microsc.* 2017;267(3):253–64
- Oron G, Son WY, Buckett W, Tulandi T, Holzner H. The association between embryo quality and perinatal outcome of singletons born after single embryo transfers: a pilot study. *Hum Reprod.* 2014;29:1444–51.
- Paria B. C. and DEY S. K. Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 87, pp. 4756-4760, June 1990 *Developmental Biology*
- Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:960–963.
- Plachot M, de Grouchy J, Junca AM, Mandelbaum J, Turleau C, Couillin P, Cohen J, Salat-Baroux J: From oocyte to embryo: a model, deduced from in vitro fertilization, for natural selection against chromosome abnormalities. *Ann Genet.* 30:22-32, 1987.
- Poulain M, Hesters L, Sanglier T, de Bantel A, Fanchin R, Frydman N, et al. Is it acceptable to destroy or include human embryos before day 5 in research programmes? *Reprod BioMed Online.* 2014;28:522–9.
- Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology and Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine: Elective single-embryo transfer. *FertilSteril* 97: 835-842, 2012.

- Pribenszky C, Nilselid A-M, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2017 Nov;35(5):511–20.
- Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod* 1987; 2:705–708.
- Reed M.L; Woodward B.J; Swain J.E “Single or group culture of mammalian embryos: the verdict of the literature” *J Reprod Stem Cell Biotechnol* 2 (2): 77-78
- Rhenman A, Berglund L, Brodin T, Olvsson M, Milton K, Hadziiosmanovic N and Holte J “Which set of embryo variables is most predictive for live birth? A prospective study in 6252 single embryo transfer to construct an embryo score for the ranking and selection of embryos” *Human Reproduction* 30: 28-36, 2015.
- Roberts, C., O’Neill, C., Wright, L., 1993. Platelet activating factor (PAF) enhances mitosis in preimplantation mouse embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 271–279.
- Sallem Amira 1,2 & Pietro Santulli3,4 & Virginie Barraud-Lange1,2 & Nathalie Le Foll1 & Lucile Ferreux1 & Chloé Maignien3 & Mathilde Bourdon3,4 & Charles Chapron3 & Dominique de Ziegler3 & Jean-Philippe Wolf1,2 & Khaled Pocate-Cheriet1 Extended culture of poor-quality supernumerary embryos improves ART outcomes *J Assist Reprod Genet* (2018) 35:311–319
- Scott L, Finn A, O’Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod* 2007;22:230–240.
- Shulman A, Ben-Nun I, Ghetler Y, Kaneti H, Shilon M and Beyth Y (1993) Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril* 60,123–126.
- Sjoblom P, Menezes J, Cummins L, Mathiyalagan B, Costello MF. Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertil Steril* 2006;86:848–861.

- Spanos, S., Becker, D.L., Winston, R.M.L., et al., 2000. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol. Reprod.* 63, 1413–1420
- Staessen C, Van Steirteghem A. The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Hum Reprod* 1998;13:1625–1631.
- Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S and Edwards RG (1992) The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 7,117–119.
- Stojanovic, T., Alechna, S., O'Neill, C., 1999. In-vitro fertilization and culture of mouse embryos in vitro significantly retards the onset of insulin-like growth factor-II expression from the zygotic genome. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 116–124.
- Szekeres-Bartho J. Successful implantation from the embryonic aspect. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. 2016;75:382–7.
- Tao Tao, Robichaud A, Mercier J, Ouellette R “Influence of group embryo culture strategies on the blastocyst development and pregnancy outcome. “*J.Assist Reprod Gent* 2013 30:63-68.
- Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, Hans E, Spach JL and Roulier R (2001) Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril* 75,525–531.
- Tesarik J, Kopečný V, Plachot M, Mandelbaum J. Ultrastructural and autoradiographic observations on multinucleated blastomeres of human cleaving embryos obtained by in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1987;2:127–136.
- Thurin A, Hausken J, Hillensjö T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, et al. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2004;351:239.
- Thurin A, Hardarson T, Hausken J, Jablonowska B, Lundin K, Pinborg A, Bergh C. Predictors of ongoing implantation in IVF in a good prognosis group of patients. *Hum Reprod* 2005;20:1876-1880.

- Vaegter K, Berglund L, Tilly J, Hadziosmanovic N, Brodin T and Holte J “Construction and validation of a prediction model to minimize twin rates at preserved high live birth rates after IVF” RBM Online volume 0, 2018.
- Van Blerkom J, Davis P and Alexander S (2001) A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Hum Reprod* 16,719–729.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W and Gerris J (1999) Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 14,2345–2349.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G and Gerris J (2001) Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum Reprod* 16,326–332.
- Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G and Gerris J (2003) Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 18,1062–1069.
- Voullaire L, Collins V, Callaghan T, McBain J, Williamson R, Wilton L. High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril.* 2007;87:1053–8.
- Walmsley R.: Multinucleation and mosaicism in the human preimplantation embryo. Cohen J, Elder K (Eds). *Human Implantation Embryo Selection*, London 2007, Informa Healthcare 41-50.
- Wintner E.M, Anat Hershko-Klement, Tzadikévitch Keren, Ghetler Yehudith, Ofer Gonen, Oren Wintner, Adrian Shulman and Amir Wisner “Does the transfer of a poor quality embryo together with a good quality embryo affect the In Vitro Fertilization (IVF) outcome? “Wintner et al. *Journal of Ovarian Research* (2017)
- WHO – Manuale di Laboratorio per l’esame del liquido seminale 2010 a cura della Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità (SIAM).
- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome

activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;28:1115-1121.

- Ziebe S, et al. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Human Reprod.* 1997;12: 1545–9.

- Zhu J, Lian Y, Li M, Chen L, Liu P, Qiao J. Does IVF cleavage stage embryo quality affect pregnancy complications and neonatal outcomes in singleton gestations after double embryo transfers. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31: 1635–41.