Pedro Augusto Araujo Monteleone

Comparação entre uma transferência eletiva de dois
embriões e duas transferências eletivas sequenciais
de um embrião: impacto nas taxas de sucesso e de
gestação múltipla

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título
de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Serafini

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Monteleone, Pedro Augusto Araujo

Comparação entre uma transferência eletiva de
dois embriões e duas transferências eletivas
sequenciais de um embrião : impacto nas taxas de
sucesso e de gestação múltipla / Pedro Augusto
Araujo Monteleone. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Paulo Cesar Serafini.

Descritores: 1.Medicina reprodutiva
2.Fertilização in vitro 3.Transferência de embrião
único 4.Taxa de gravidez 5.Gravidez de gêmeos

USP/FM/DBD-376/17

Pedro Augusto Araujo Monteleone

Comparação entre uma transferência eletiva de dois
embriões e duas transferências eletivas sequenciais
de um embrião: impacto nas taxas de sucesso e de
gestação múltipla

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título
de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Serafini

São Paulo

2017

DEDICATÓRIA

A minha esposa, Carla Luciana Galli Monteleone, que esteve ao meu lado em todos os momentos, viabilizando a concretização deste trabalho.

As minhas filhas Juliana, Maria Eduarda e Ana Luiza

Aos meus pais Maria Lucia e Pepe responsáveis por tudo aquilo que construí e construo, pelos ensinamentos, broncas e conselhos ao longo destes anos

A todos os meus familiares e amigos, colegas que me apoiaram e torcem por mim sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Serafini, orientador deste trabalho, por ter acreditado nesta proposta, e pela orientação dada sempre com muita paciência, seriedade e discernimento.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, coordenador do Programa de Pós Graduação do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração e orientação imprescindíveis para a concretização deste estudo.

À equipe de embriologistas e médicos do Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas Divisão de Clínica Ginecológica do HC-FMUSP e da Clínica Monteleone – Centro de Reprodução Humana, pela colaboração na coleta dos dados das participantes deste estudo.

À Silvia Regina Mancini, da Divisão de Clínica Ginecológica do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo auxílio nas questões éticas e administrativas para o desenvolvimento deste estudo.

À Lucinda Pereira, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração na organização da Qualificação e Defesa desta Tese.

Ao Dr. Sergio Gonçalves, médico da Clínica Monteleone, pela colaboração na revisão desta Tese.

Ao Dr. Pedro Peregrino, médico colaborador do Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas Divisão de Clínica Ginecológica do HC-FMUSP e Clínica Monteleone, pela colaboração na revisão desta Tese.

Aos colegas Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas Divisão de Clínica Ginecológica do HC-FMUSP e da Clínica Monteleone – Centro de Reprodução Humana, pela colaboração, amizade e incentivo constante.

À Profa. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco, Chefe do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Aos casais participantes deste estudo, pela colaboração e boa vontade de autorizarem a utilização dos dados de seus ciclos de tratamento para fins científicos, pois sem eles seria impossível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	vii
Lista de tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1 Introdução	1
2 Objetivos	7
2.1 Geral	7
2.2 Específicos	7
3 Métodos	8
3.1 Ética	8
3.2 Casuística	8
3.3 Desenho do estudo	8
3.4 Estimulação ovariana controlada e fertilização de oócitos	11
3.5 Coleta de dados clínicos	13
3.6 Análise estatística	13
4 Resultados	14
4.1 Características gerais dos grupos de estudo	14
4.2 Resultados clínicos após a primeira transferência de dois (DET) ou um (SET) embrião	15
4.2.1 Resultados clínicos após a primeira transferência de dois (DET) ou um (SET) embrião em estágio de blastocisto	17
4.3 Resultados clínicos após a segunda transferência embrionária no grupo set 19	19
4.4 Resultados clínicos após a transferência de dois embriões	20
5 Discussão	24
6 Conclusão	Erro! Indicador não definido.
7 Anexo A	31
8 Referências	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, do inglês <i>American Society of Reproductive Medicine</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês <i>Center for Diseases Control and Prevention</i>
CO ₂	Gás carbônico
DET	Transferência de dois embriões, do inglês <i>double embryo transfer</i>
eSET	Transferência eletiva de embrião único, do inglês <i>elective Single Embryo Transfer</i>
EUA	Estados Unidos da América
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina, do inglês <i>Gonadotrophin releasing Hormone</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HSA	Albumina sérica humana, do inglês <i>human serum albumin</i>
Kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
ml	Mililitro
mm	Milímetro
N ₂	Nitrogênio
O ₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
PN	Pró-núcleos
rFSH	Hormônio folículo estimulante recombinante, do inglês <i>recombinant Follicle Stimulating Hormone</i>
rhCG	Gonadotrofina coriônica humana recombinante, do inglês <i>recombinant human Corioni Gonadotrophin</i>
SART	Sociedade para Tecnologias de Reprodução Assistida, do inglês <i>Society for Assisted Reproductive Technologies</i>
SET	Transferência de embrião único, do inglês <i>Single Embryo Transfer</i>
SPSS	Pacote estatístico para ciências sociais, do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TE	Transferência embrionária
TRA	Técnicas de Reprodução Assistida
UI	Unidades Internacionais
UI/ml	Unidades Internacionais por mililitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados demográficos e características clínicas dos ciclos de tratamento de reprodução assistida	14
Tabela 2: Resultados clínicos dos grupos DET e SET após a primeira transferência embrionária, subdivididos em ciclos com transferências a fresco e de embriões descongelados.	16
Tabela 3: Dados demográficos e características clínicas dos ciclos de tratamento de reprodução assistida com transferência de blastocisto	17
Tabela 4: Resultados clínicos dos grupos DET e SET após a primeira transferência embrionária, subdivididos em ciclos com transferências a fresco e de embriões descongelados.	18
Tabela 5: Resultados clínicos dos grupos DET e SET acumulado.	21
Tabela 6: Análise de regressão logística múltipla avaliando a associação entre a transferência de dois embriões um a um (SET-SET) comparado a uma única transferência (DET) e a ocorrência de gestação clínica acumulada, ajustado para as variáveis possivelmente intervenientes.	23
Tabela 7: Análise de regressão logística múltipla avaliando a associação entre a transferência de dois embriões um a um (SET-SET) comparado a uma única transferência (DET) e a ocorrência de gestação múltipla acumulada, ajustado para as variáveis possivelmente intervenientes.	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma representativo do desenho do estudo. A: Grupo DET. B: Grupo SET.....	11
Figura 2: Distribuição dos fatores de infertilidade nos grupos de estudo DET e SET	15
Figura 3: Gráfico representativo dos resultados de gestação clínica e gestação múltipla nos grupos DET e SET após a primeira transferência embrionária.....	16
Figura 4: Gráfico representativo dos resultados de gestação clínica e gestação múltipla nos grupos DET e SET após a primeira transferência de embriões em estágio de blastocisto.	19
Figura 5: Gráfico representativo dos resultados clínicos nos grupos SET-DET e SET-SET após a segunda transferência de embriões em estágio de blastocisto.....	20
Figura 6: Gráfico representativo dos resultados de gestação clínica e gestação múltipla nos grupos DET e SETacumulado após a transferência de dois embriões.	22

RESUMO

Monteleone PAA. Comparação entre uma transferência eletiva de dois embriões e duas transferências eletivas sequenciais de um embrião: impacto nas taxas de sucesso e de gestação múltipla [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: Sabe-se que as técnicas de reprodução assistida estão associadas com potenciais riscos, principalmente relacionados às gestações múltiplas, em torno de 20 a 25%, em consequência da estimulação ovariana associada à transferência de vários embriões. As gestações múltiplas apresentam maior incidência de complicações maternas e neonatais, além de aumentarem consideravelmente a proporção de partos cesarianos. Frente a esta realidade, as gestações múltiplas podem ser evitadas pela transferência eletiva de embrião único (eSET, do inglês *elective Single Embryo Transfer*), uma prática que vem crescendo em todo mundo. Apesar dos diversos estudos publicados, o grande desafio ainda é comprovar os benefícios da eSET aplicada corretamente, impactando na incidência das complicações sem comprometimento do sucesso do tratamento. O objetivo deste estudo foi comparar as taxas de sucesso cumulativas da transferência eletiva de até dois embriões transferidos um a um (eSET), versus a taxa de sucesso da transferência eletiva de dois embriões em um único evento (DET, do inglês *Double Embryo Transfer*), em casais inférteis de bom prognóstico. **MÉTODOS:** Estudo retrospectivo avaliou 610 casais inférteis de bom prognóstico submetidos às TRA, divididos em dois grupos: grupo SET: pacientes submetidas à transferência eletiva de um único embrião de boa qualidade e que possuíam ao menos um embrião excedente congelado (grupo SET, n=237), possibilitando uma segunda transferência eletiva de um embrião descongelado em caso de não ocorrência de gestação; e grupo DET: pacientes submetidas a transferência eletiva de dois embriões de boa qualidade e que possuíam ao menos um embrião excedente (grupo DET, n=373). **RESULTADOS:** As taxas de gestação clínica acumulada após a transferência de dois embriões foram semelhantes (DET: 46.6% e SET acumulado: 45,9%; p=0,898). Por outro lado, a taxa de gestação múltipla foi significativamente inferior no grupo que recebeu transferência de dois embriões um a um versus a transferência eletiva de dois embriões em um único evento (DET: 32,2% e SET acumulado: 6,1%; p<0,001). **CONCLUSÕES:** A política de SET deve ser estimulada para casais de bom prognóstico, já que resulta em taxas de gestação clínica acumulada semelhantes a DET, evita gestações múltiplas e consequentemente as complicações materno-fetais, levando a reduzido custo indireto do tratamento quando considera-se os gastos obstétricos e neonatais.

Descritores: medicina reprodutiva; fertilização in vitro; transferência de embrião único; taxa de gravidez; gravidez de gêmeos

ABSTRACT

Monteleone PAA. Comparison between elective transfer of two embryos and two sequential elective single embryo transfer: impact on success rates and multiple pregnancies [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

INTRODUCTION: It is known that Assisted Reproductive Techniques are associated with potential risks, mainly related to multiple pregnancies, which are around 20 to 25% due to ovarian stimulation associated with high number of embryos transferred. Multiple pregnancies lead to higher incidence of complications for mother and newborns, as well as a significant increase in the proportion of cesarean deliveries. This way, iatrogenic multiple pregnancies can be avoided by the elective single embryo transfer (eSET), a growing practice worldwide. Despite the several published studies, adequately applied eSET, which impact on the incidence of complications without compromising treatment success, is still a challenge. The aim of this study was to compare the cumulative success rates of elective transfer of two embryos when transferred one by one (eSET), versus the success rates of elective double embryos transfer (DET) in a single procedure, in a good prognosis population. **METHODS:** This retrospective study evaluated 610 good prognosis infertile couples undergoing ART, split into two groups: SET group included those receiving elective single good quality embryo transfer and having at least one spared good quality embryo cryopreserved (SET group, n=237). For those who did not become pregnant, they could receive a second frozen-thawed elective embryo transfer; and DET group (n=373) who received elective transfer of two good quality embryos in the first transfer and had at least one spared good quality embryo cryopreserved. **RESULTS:** The accumulated clinical pregnancy outcomes after a transfer of two embryos were similar between groups (DET: 46.6% vs accumulated SET: 45.9%; $p=0.898$). On the other hand, the multiple pregnancy rate was significantly lower in the group receiving transfer of two embryos, one by one, compared to DET in a single procedure (DET: 32.2% vs accumulated SET: 6.1%; $p<0.001$). **CONCLUSIONS:** The SET policy should be stimulated for good prognosis couples, as it maintain the accumulated clinical pregnancy rates, avoid multiples pregnancies and consequently the maternal and neonates complication and indirect costs of treatment when considering obstetrics spends are reduced.

Descriptors: reproductive medicine; fertilization in vitro; single embryo transfer; pregnancy rate; pregnancy, twin

1 INTRODUÇÃO

O nascimento da primeira criança pelas técnicas de reprodução assistida (TRA) ocorreu em 1978 e, desde então, tecnologias avançadas vêm sendo cada vez mais utilizadas a fim de transpor as questões relacionadas à infertilidade conjugal, auxiliando os casais inférteis a obterem a gestação. O número de ciclos utilizando TRA aproximadamente triplicou em duas décadas, chegando a mais de 200 mil procedimentos nos Estados Unidos, reportados ao CDC (*Center for Diseases and Control*) em 2014. Esses números representam uma taxa média de 2.647 procedimentos de TRA por milhão de mulheres em idade reprodutiva (Sunderam et al., 2017).

Por outro lado, as TRA estão associadas a potenciais riscos e complicações materno-fetais e neonatais, principalmente relacionados às gestações múltiplas. Nos Estados Unidos, em 2014, entre os ciclos com intenção de transferência de pelo menos um embrião, 81,4% resultaram em transferência embrionária (TE), com 50% de gestação e 40,6% de taxa de nascidos vivos. A taxa de gestações múltiplas foi de 22,3%, o que significa que 39,4% de todos os recém-nascidos por TRA são provenientes de gestações múltiplas, comparado a 3,5% em concepções naturais. Entre as gestações múltiplas, a maioria refere-se a gêmeos (95,3%) (Sunderam et al., 2017).

É evidente a relação das gestações múltiplas com o número de embriões transferidos (Kallen et al., 2005a). A experiência na Suécia demonstra claramente esta associação, já que, no início da utilização das técnicas de fertilização *in vitro* (FIV), era comum a transferência de três ou mais embriões, com taxa de gestações múltiplas de 29%. Após um acordo entre as clínicas de FIV suecas, no início da década de 90, para a redução da transferência de 3 para 2 embriões, essas taxas caíram para 18,5% (Kallen et al., 2005b). Uma nova recomendação foi feita posteriormente no início dos anos

2000 indicando a transferência preferencial de embrião único, o que resultou em redução das gestações múltiplas para 5% (Kallen et al., 2010).

As adversidades das gestações múltiplas são bem conhecidas. Os riscos maternos incluem maior taxa de partos cesarianos, hemorragia pós-parto, hipertensão, pré-eclâmpsia e diabetes gestacional. Para o neonato, riscos de prematuridade, baixo peso ao nascimento, mortalidade perinatal, malformações e comprometimento do desenvolvimento. A taxa de mortalidade perinatal é quatro vezes maior em gestações gemelares e seis vezes maior nas trigemelares quando comparada com as gestações únicas (Zollner and Dietl, 2013; Chambers et al., 2014; Murray and Norman, 2014). Além das complicações perinatais, os riscos de hospitalização de crianças gemelares são cinco vezes maiores do que de crianças nascidas de gestações únicas, com aumento significativo nos custos decorrentes de hospitalizações nos cinco primeiros anos de vida (van Heesch et al., 2015).

Evidenciando a relação entre os riscos neonatais inerentes às gestações múltiplas, estudos finlandês (Klemetti et al., 2002) e sueco (Kallen et al., 2005b) demonstraram diminuição do risco de nascimentos pré-termo associado à redução das gestações múltiplas em decorrência da diminuição do número de embriões transferidos nos ciclos de FIV. Outro estudo sueco (Kallen et al., 2010) analisou a evolução das condições maternas e neonatais em ciclos de FIV por um período de 25 anos. Neste estudo, foi ratificada a drástica redução nos nascimentos pré-termo, de baixo peso, risco de hemorragia intracraniana e sintomas respiratórios concomitantes à diminuição da incidência de gestações múltiplas no país. Essas experiências incentivam a identificação de populações de casais inférteis de bom prognóstico que se beneficiariam da transferência de um único embrião, diminuindo os riscos materno-fetais, sem prejuízo nas taxas de sucesso de gestação nos tratamentos de FIV.

Ao longo dos últimos anos a prática de protocolos de transferência eletiva de embrião único (eSET, do inglês *elective Single Embryo Transfer*) cresceu de forma significativa, o que ajuda a evitar gestações múltiplas iatrogênicas. A eSET é o procedimento no qual um embrião é selecionado a partir de uma coorte de embriões disponíveis para a transferência, e os excedentes são criopreservados. Transferências

de apenas um embrião, mas sem embriões excedentes criopreservados, são consideradas transferências de embrião único (SET), mas não eletivas (eSET), (Sunderam et al., 2017). Na Europa, apesar de haver variação entre os países, influenciada pela cobertura dos planos de saúde, legislação, guias de sociedades médicas, população e cultura, a taxa de eSET é, em média, 20%, sendo de até 69% na Suécia. Nos Estados Unidos, a porcentagem de eSET ainda é baixa, apesar de aumento significativo de 7,4% (2009) para 28,5% (2014) entre mulheres até 35 anos de idade (Sunderam et al., 2017). Na América Latina, a proporção de ciclos com eSET é ainda menor, de apenas 2%, de acordo com o registro da Rede Latino-Americana de Reprodução Assistida (Zegers-Hochschild et al., 2016). As taxas de eSET nos Estados Unidos e América latina são menores do que em países que impõe restrições ao número de embriões transferidos e nos quais os tratamentos de reprodução assistida são financiados por verbas públicas, já que a tomada de decisão quanto ao número de embriões transferidos fica a cargo do médico e do casal (Maheshwari et al., 2011).

Além da influência de diversos fatores relacionados aos aspectos prognósticos e do alto custo do tratamento para o casal, há também um equívoco entre os conceitos de chance de gestação e de se obter um recém-nascido saudável, o que afeta a tomada de decisão para utilização eSET. O objetivo primordial da utilização das TRA é propiciar gestação aos casais. Entretanto, o objetivo final é ter um recém-nascido saudável. Esses dois conceitos podem ser confundidos e mesmo que a transferência de mais de um embrião possa aumentar a chance de gestação, não se pode desconsiderar o aumento significativo de complicações maternas e perinatais nas gestações múltiplas (Min et al., 2010; Practice Committee of American Society for Reproductive, 2012).

Mesmo ainda com taxas abaixo do ideal, o aumento da eSET nos EUA levou à diminuição na porcentagem de nascimentos múltiplos de 53,1% em 2000 para 39,4% em 2014. Entretanto, a maior queda se deve à porcentagem de gestação triplas ou de alta ordem (de 8,9% para 1,8%), mas com discreta diminuição das gestações de gêmeos (de 44,2% para 37,5%), devido à ainda prevalente prática da transferência de dois embriões (Sunderam et al., 2017). Dentro deste conceito, observa-se que a transferência de dois embriões está associada a um aumento pouco significativo das

taxas de nascidos vivos, mas com grande impacto nas taxas de gemelaridade e suas consequentes complicações neonatais, quando comparada a eSET (Steinberg et al., 2013; Kissin et al., 2014). Por outro lado, a transferência de dois embriões sequencialmente, ou seja eSET em dois procedimentos consecutivos, quando corretamente aplicado a pacientes de bom prognóstico, resulta em taxa cumulativa de nascidos vivos similar à da transferência de dois embriões em um único procedimento, com a vantagem da redução na taxa de gemelaridade (McLernon et al., 2010; Luke et al., 2015) e nos custos finais do tratamento (Crawford et al., 2016).

Considerando que a taxa média de sucesso de tratamentos de FIV está em torno de 50% de gestação e 40% de nascidos vivos (Sunderam et al., 2017), os tratamentos consecutivos são prática rotineira em clínicas de TRA, independentemente do número de embriões transferidos, já que aproximadamente metade dos casais não alcançam sucesso na primeira tentativa. Dessa forma, para os casais de bom prognóstico, a proposta de transferência de dois embriões sequencias, ou seja, eSET em dois procedimentos consecutivos quando há falha na primeira transferência, poderia ser aplicada sem grande impacto na prática clínica.

Nestas situações, deve-se levar em consideração o componente social e de ansiedade dos casais em tratamento. Tais aspectos exigem da equipe médica agilidade e eficácia na tentativa de se obter sucesso em menor tempo possível, representando muitas vezes um obstáculo para a eSET sequencial (Ezugwu and der Burg, 2015), uma vez que a literatura consagra que a transferência de dois embriões (DET, do inglês *double embryo transfer*) em um único ciclo de tratamento resulta em taxa de sucesso superior à da transferência de um único embrião, quando o bom prognóstico clínico do casal não é levado em consideração (Baruffi et al., 2009; Fujimoto et al., 2015).

Em um modelo de saúde como o praticado no Brasil, no qual mais de 80% dos tratamentos não são cobertos pelo Sistema Único de Saúde ou por planos de assistência médica, ou seja, são exclusivamente privados (Zegers-Hochschild et al., 2016), a repetição consecutiva da eSET poderia sugerir, em uma visão superficial, o aumento do custo direto do tratamento para os casais que o realizam. No entanto, os custos indiretos advindos de uma gestação múltipla, com consequências maternas e

neonatais, ultrapassaria em muito as despesas diretas com os ciclos de tratamento, como evidenciado em levantamento nos Estados Unidos; onde o custo dos cuidados de saúde para o paciente e planos de saúde nas gestações provenientes de TRA ficam em torno de US\$ 27.000,00 para gestações únicas e aumentam para US\$ 115.000,00 e 435.000,00, respectivamente nas gemelares e trigemelares (Lemos et al., 2013). Contudo, no Brasil, essas despesas relacionadas aos resultados perinatais são geralmente arcadas pelo sistema de saúde privado ou público e não pelo próprio paciente.

Unindo as questões financeiras e expectativas dos casais em tratamento de infertilidade, o grande desafio é demonstrar os benefícios da eSET quando aplicada corretamente para casais de bom prognóstico, diminuindo a incidência das complicações de uma possível gestação múltipla, sem comprometer o sucesso do tratamento. Estudo conduzido através de questionários aplicados a pacientes e médicos avaliou a percepção em relação a eSET e gemelaridade demonstrando que ambos os grupos não eram favoráveis à gestação múltipla, mas, ao mesmo tempo, também apresentaram percepção negativa para a eSET. Os resultados evidenciam que pacientes e médicos se beneficiariam de orientação sobre os riscos para os neonatos em uma gravidez gemelar (Rai et al., 2011). A educação do paciente em relação à morbidade e mortalidade materna e neonatal decorrente das gestações gemelares, assim como nos custos destas condições, é efetiva em reduzir a preferência por gêmeos entre os casais em tratamento (Murray et al., 2004; Hope and Rombauts, 2010).

A redução do número de embriões transferidos também tem sido defendida pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM, *American Society for Reproductive Medicine*) e Sociedade para Tecnologias de Reprodução Assistida (SART, *Society for Assisted Reproductive Technologies*). Tais entidades recomendam a eSET levando em consideração o prognóstico do casal. Além disso, deve-se levar em consideração a qualidade embrionária e a qualidade individual dos programas de criopreservação de embriões. Ao mesmo tempo, os comitês reconhecem os desafios para a utilização de eSET e argumentam a necessidade de informação e esclarecimento

para as pacientes, aspectos financeiros e o reconhecimento pelas partes envolvidas de que o sucesso de um tratamento por técnicas de reprodução assistida é o nascimento de uma criança saudável (Practice Committee of American Society for Reproductive, 2012). Assim, propusemo-nos a avaliar o benefício da transferência eletiva de um menor número de embriões com redução da ocorrência de múltiplos sem repercussão no resultado final do tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Comparar as taxas de sucesso cumulativas da transferência eletiva de até dois embriões transferidos um a um, versus a taxa de sucesso da transferência eletiva de dois embriões em um único evento, em população de bom prognóstico.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Comparar resultados de ciclos de transferências eletivas de embriões a fresco e descongelados;
2. Comparar os resultados entre transferências eletivas de dois versus um embrião no estágio de blastocisto;
3. Comparar as taxas de gestação múltipla entre o ciclo de transferência eletiva de dois embriões e de um embrião seguida da transferência eletiva de um segundo embrião criopreservado.

3 MÉTODOS

3.1 ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob número 1.151.345 em 15/07/2015, no qual foi dispensada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por se tratar de estudo retrospectivo utilizando dados armazenados em prontuários (Anexo 1).

3.2 CASUÍSTICA

Este estudo foi realizado através de uma parceria entre o Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas Divisão de Clínica Ginecológica do HC-FMUSP e a Clínica Monteleone – Centro de Reprodução Humana, São Paulo - SP. Foi feita a coleta de informações dos ciclos de fertilização *in vitro* a partir do banco de dados de pacientes que realizaram tratamento de infertilidade para obtenção de gestação nos centros supracitados, no período de janeiro de 2010 a março de 2016.

3.3 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo coorte retrospectivo baseado na coleta de dados de ciclos de fertilização *in vitro*. Os critérios de inclusão para a seleção foram:

- Casais submetidos a ciclos de fertilização *in vitro* de alta complexidade, utilizando injeção intracitoplasmática de espermatozoides – ICSI;
- Idade da mulher entre 18 e 38 anos;
- Ter realizado no máximo um ciclo de tratamento anterior;

- Ter realizado a transferência eletiva de um ou dois embriões de boa qualidade e ter pelo menos um embrião excedente de boa qualidade criopreservado.

Não foram incluídos no estudo casos em que ocorreu:

- Utilização de espermatozoides para fertilização provenientes de parceiro apresentando azoospermia não obstrutiva;
- Mulheres com doenças sistêmicas associadas; presença de malformações uterinas; cirurgia prévia para retirada de miomas submucosos;
- Diagnóstico de doenças infectocontagiosas com possibilidade de transmissão vertical;

As mulheres foram divididas em dois grupos: grupo SET: pacientes submetidas a transferência eletiva de um único embrião de boa qualidade fresco (SET-FRESCO) ou descongelado (SET-DESC) e que possuíam ao menos um embrião excedente congelado; grupo DET: aquelas submetidas a transferência eletiva de dois embriões de boa qualidade na primeira transferência fresco (DET-FRESCO) ou descongelado (DET-DESC) e que possuíam ao menos um embrião excedente. Para os casais do grupo SET que não obtiveram a gestação, houve a possibilidade de segundo ciclo de transferência eletiva de embrião descongelado (Grupo SET2) (Figuras 1A e 1B).

A GRUPO DET

B GRUPO SET

Figura 1: Fluxograma representativo do desenho do estudo. A: Grupo DET. B: Grupo SET

3.4 ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA E FERTILIZAÇÃO DE OÓCITOS

A estimulação ovariana foi realizada conforme protocolos de avaliação e tratamento da instituição. Resumidamente, as pacientes receberam análogo de GnRH, agonista (Lupron kitTM, Abbot SA Societé Française des Laboratories, France) ou antagonista (Cetrotide[®], MerckSerono, Suíça) para bloqueio hipofisário e gonadotrofina recombinante (rFSH, Gonal-F[®], MerckSerono, Suíça) para estimulação ovariana controlada, sendo que mulheres até 35 anos receberam 150 UI/dia de gonadotrofinas e mulheres de 35 a 38 anos receberam 225 UI/dia de gonadotrofina como dose inicial. As pacientes foram submetidas a ultrassonografias transvaginais seriadas para acompanhamento do desenvolvimento folicular e as doses de gonadotrofinas foram ajustadas de acordo com a resposta ovariana, se necessário. A maturação folicular final foi realizada pela administração de gonadotrofina coriônica humana recombinante (rhCG, Ovidrel[®], Serono, Suíça) quando apresentaram pelo menos dois folículos com diâmetro de 18 mm. A punção folicular foi realizada 36 horas após a administração do rhCG. Após a captação, todos os oócitos foram submetidos a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Palermo et al., 1992).

A fertilização foi checada 18 horas após a ICSI sendo considerada normal quando dois pronúcleos (2PN) distintos estavam presentes. Os embriões foram cultivados em gotas de 40uL de meio de cultura Global (Life Global, EUA) suplementado com 10% de albumina sérica humana (HSA, Irvine Scientific, EUA) sob uma camada de óleo mineral (Ovoil, Vitrolife, EUA). Os embriões foram mantidos em incubadora triplo gás (90% N₂, 5% O₂ and 6% CO₂) a 37°C. A qualidade embrionária foi avaliada diariamente em microscópio invertido até a transferência. Os seguintes parâmetros embrionários foram avaliados: (i) número de blastômeros, (ii) porcentagem de fragmentação, (iii) simetria, (iv) presença de multinucleação, (v) defeitos no citoplasma e zona pelúcida. Embriões considerados de boa qualidade no

terceiro dia de desenvolvimento foram aqueles apresentando de 8 a 10 células simétricas, sem multinucleação e com no máximo 20% de fragmentação (Veeck, 1999). Para os embriões cultivados até o estágio de blastocisto, a avaliação morfológica levou em consideração o grau de expansão e o número e organização das células da massa celular interna e do trofoectoderma. Foram considerados blastocistos de boa qualidade aqueles apresentando-se expandidos (grau 3 ou 4), com massa celular interna graus A ou B e trofoectoderma A ou B (Gardner et al., 2000). Somente embriões de boa qualidade foram transferidos ou criopreservados. Para a vitrificação foi utilizado *Vitrification Freeze kit* (Irvine Scientific, EUA) com palheta do tipo *Cryotip* (Irvine Scientific, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. Para o descongelamento dos embriões utilizou-se *Vitrification Thaw kit* (Irvine Scientific, EUA).

Para a transferência embrionária (TE) a fresco, os embriões no terceiro ou quinto dia do desenvolvimento foram colocados no cateter de transferência e depositados na cavidade uterina. Para a transferência de embriões criopreservados nos casos em que a gestação não ocorreu no primeiro ciclo, as pacientes receberam, para o preparo endometrial, 100 microgramas de estradiol via transdérmica (Estradot, Novartis), e quando o endométrio atingiu espessura superior a 7 mm, iniciou-se administração de 600 miligramas diárias de progesterona natural micronizada (Utrogestan, Farmoquímica) por via vaginal. Os embriões foram descongelados e avaliados quanto à sobrevivência e, em seguida, transferidos para a cavidade uterina das pacientes no quinto dia após o início da progesterona, de acordo com protocolo padrão. A gestação bioquímica foi confirmada por dosagem sérica de beta-hCG, 9 a 12 dias após a transferência embrionária, e a gestação clínica foi confirmada por ultrassonografia com a presença de saco gestacional com batimento cardíaco duas semanas após a detecção do beta-hCG positivo.

3.5 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Cada casal possui um cadastro onde constam os dados clínicos e laboratoriais obtidos durante o ciclo de reprodução assistida, assim como dados obstétricos das gestantes. Tais informações foram tabuladas e analisadas neste estudo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises descritivas incluíram média e desvio-padrão para as variáveis numéricas e frequências e porcentagens para as variáveis categóricas. As variáveis quantitativas foram comparadas utilizando o teste t de Student e as variáveis categóricas utilizando Teste Qui-quadrado de Pearson. O valor $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico para ciências sociais (SPSS, do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*, IBM, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRUPOS DE ESTUDO

Os dados demográficos dos grupos de estudo estão descritos na Tabela 1. Observamos que as características gerais dos grupos de estudo DET e SET foram semelhantes, exceto para o tempo de infertilidade e a dose de gonadotrofina administrada. Quanto ao tempo de infertilidade, a diferença de tempo observada não representa relevância clínica. Com relação a dose de gonadotrofina, o grupo DET recebeu uma dose maior de gonadotrofina que o grupo SET. Entretanto, como a dose de gonadotrofina é ajustada de acordo com a resposta da paciente objetivando a coleta de um número adequado de oócitos, o resultado do estímulo foi semelhante entre os grupos; como pode ser notado pela equivalência no número de oócitos coletados, tornando a diferença entre a dose de gonadotrofina administrada sem significância clínica.

Tabela 1: Dados demográficos e características clínicas dos ciclos de tratamento de reprodução assistida

	DET	SET	p
Número de ciclos	373	237	
Idade (anos)	33,6±2,9	33,9±3,1	0,156
IMC (Kg/m ²)	23,1±3,4	22,5±3,0	0,066
Tempo de infertilidade (anos)	2,9±2,1	2,4±1,8	0,006
Dosagem de FSH basal (UI/ml)	6,1±3,9	6,3±5,2	0,786
Dose de gonadotrofina administrada (UI)	1855±500	1709±258	<0,001
Número de oócitos coletados	14,0±7,7	13,4±8,1	0,344
Número de oócitos MII coletados	11,4±6,4	10,8±6,3	0,258
Taxa de fertilização (%)	83,0%	83,8%	0,524
Número de embriões criopreservados	6,6±4,5	7,0±4,5	0,216

As pacientes incluídas no estudo foram categorizadas de acordo com os fatores de infertilidade classificados segundo a *Society for Assisted Reproductive Medicine* (SART) e as frequências comparadas entre os grupos DET e SET (Figura 2).

Figura 2: Distribuição dos fatores de infertilidade nos grupos de estudo DET e SET

4.2 RESULTADOS CLÍNICOS APÓS A PRIMEIRA TRANSFERÊNCIA DE DOIS (DET) OU UM (SET) EMBRIÃO

A fim de avaliar se houve diferença nos resultados clínicos quando a primeira TE foi realizada a fresco ou com embriões descongelados para cada grupo (DET ou SET), foram comparadas as taxas de gestação bioquímica, gestação clínica, implantação e gestação múltipla (Tabela 2). Observamos que as taxas de implantação

e gestação bioquímica foram superiores nos subgrupos que realizaram a primeira transferência de embriões descongelados no grupo DET. Entretanto os resultados clínicos (taxa de gestação clínica e múltipla) foram semelhantes para ambos os grupos.

Tabela 2: Resultados clínicos dos grupos DET e SET após a primeira transferência embrionária, subdivididos em ciclos com transferências a fresco e de embriões descongelados.

	DET-FRESCO	DET-DESCONG	p	SET-FRESCO	SET-DESCONG	p
Taxa de gestação bioquímica	60,1%	75,3%	0,010	36,4%	48,0%	0,134
Taxa de implantação	34,9%	43,5%	0,051	32,1%	42,0%	0,191
Taxa de aborto	16,1%	24,1%	0,179	18,3%	28,6%	0,321
Taxa de gestação clínica	45,1%	51,8%	0,282	26,2%	30,0%	0,591
Taxa de gestação múltipla	30,8%	36,4%	0,325	4,1%	0,0%	0,427

Frente a homogeneidade dos resultados clínicos nos ciclos com transferência a fresco e de embriões descongelados, as taxas de gestação clínica e múltipla foram comparadas entre os grupos DET e SET como um todo (Figura 3).

Figura 3: Gráfico representativo dos resultados de gestação clínica e gestação múltipla nos grupos DET e SET após a primeira transferência embrionária.

4.2.1 Resultados clínicos após a primeira transferência de dois (DET) ou um (SET) embrião em estágio de blastocisto

A fim de observar os resultados quando apenas transferências de blastocistos foram realizadas, os ciclos com transferências de embriões em estágio de clivagem (dia 3 do desenvolvimento) foram excluídos. Dessa forma, 241 ciclos (80 ciclos no grupo SET e 161 ciclos no grupo DET) foram reanalisados.

A Tabela 3 mostra os dados demográficos deste subgrupo de pacientes, os quais foram semelhantes exceto para dose de gonadotrofina administrada e número de embriões criopreservados. Entretanto, da mesma forma que ocorreu para o grupo de pacientes como um todo, tais diferenças apesar de significantes estatisticamente, não apresentam relevância clínica.

Tabela 3: Dados demográficos e características clínicas dos ciclos de tratamento de reprodução assistida com transferência de blastocisto

	SET	DET	p
Número de ciclos	80	161	
Idade (anos)	33,3±3,5	33,3±2,9	0,962
IMC (Kg/m ²)	21,8±2,8	22,7±2,9	0,083
Tempo de infertilidade (anos)	2,3±1,8	2,8±1,8	0,155
Dosagem de FSH basal (UI/ml)	5,8±2,6	5,6±3,2	0,704
Dose de gonadotrofina administrada (UI)	1632±270	1858±488	<0,001
Número de oócitos coletados	19,0±9,7	16,8±8,7	0,079
Número de oócitos MII coletados	15,0±7,4	13,5±7,4	0,135
Taxa de fertilização (%)	83,9%	81,2%	0,196
Número de embriões criopreservados	9,6±5,2	7,7±5,2	0,009

Após a primeira transferência de embriões apenas em estágio de blastocisto a fresco ou descongelados para cada grupo (DET ou SET), foram também comparadas as taxas de gestação bioquímica, gestação clínica, implantação e gestação múltipla (Tabela 4). Observamos que no grupo DET, apesar das taxas de gestação bioquímica, implantação e aborto serem superiores nos subgrupos que realizaram a primeira

transferência de blastocistos descongelados, as taxas de gestação clínica e gestação múltipla foram similares. Não houve diferenças no grupo SET entre transferências de blastocistos a fresco ou descongelados.

Tabela 4: Resultados clínicos dos grupos DET e SET após a primeira transferência embrionária, subdivididos em ciclos com transferências a fresco e de embriões descongelados.

	DET- FRESCO	DET- DESCONG	p	SET- FRESCO	SET- DESCONG	p
Taxa de gestação bioquímica	56,4%	79,1%	0,003	45,5%	51,1%	0,621
Taxa de implantação	35,1%	47,0%	0,046	36,4%	44,7%	0,463
Taxa de aborto	12,5%	27,1%	0,073	16,7%	28,6%	0,443
Taxa de gestação clínica	44,7%	52,2%	0,344	30,3%	31,9%	0,878
Taxa de gestação múltipla	35,7%	42,9%	0,522	0,0%	0,0%	---

Da mesma forma que no item anterior, como os resultados de gestação clínica e múltipla nos ciclos com transferência de blastocistos a fresco e descongelados foram homogêneos tais taxas foram comparadas entre os grupos DET e SET como um todo (Figura 4).

Figura 4: Gráfico representativo dos resultados de gestação clínica e gestação múltipla nos grupos DET e SET após a primeira transferência de embriões em estágio de blastocisto.

4.3 RESULTADOS CLÍNICOS APÓS A SEGUNDA TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA NO GRUPO SET

No grupo SET, 173 pacientes que não engravidaram na primeira transferência eram candidatas a receberem a segunda transferência de embriões descongelados. Dessas, 11 pacientes optaram por não realizar a segunda transferência e foram excluídas desta etapa de análise. Das 162 pacientes restantes que realizaram a segunda transferência, foram estabelecidos dois subgrupos: 109 pacientes que receberam dois embriões na segunda transferência (SET-DET) e 53 pacientes que receberam um embrião na segunda transferência (SET-SET).

Com objetivo de avaliar o resultado da segunda transferência, os subgrupos SET-DET e SET-SET foram comparados quanto as taxas de implantação, gestação bioquímica, aborto, gestação clínica e gestação múltipla (Tabela 5). Apesar da taxa de implantação ser superior no subgrupo SET-SET, como esperado, os resultados clínicos foram semelhantes, exceto pela taxa de gestação múltipla que foi superior no grupo SET-DET.

Figura 5: Gráfico representativo dos resultados clínicos nos grupos SET-DET e SET-SET após a segunda transferência de embriões em estágio de blastocisto.

4.4 RESULTADOS CLÍNICOS APÓS A TRANSFERÊNCIA DE DOIS EMBRIÕES

A fim de comparar os resultados clínicos após a transferência de dois embriões no grupo DET, os quais foram transferidos em um único procedimento, com as pacientes receberam um embrião na primeira transferência embrionária e um embrião na segunda transferência (para as que não engravidaram inicialmente), os resultados acumulados após as duas transferências no grupo SET foram calculados (SETacumulado).

Nesta etapa de análise, os grupos foram constituídos da seguinte forma: pacientes que receberam dois embriões na primeira transferência (grupo DET) e pacientes que receberam um embrião na primeira transferência e engravidaram mais as que tiveram falha na primeira tentativa e receberam mais um embrião na segunda transferência (grupo SETacumulado). Para o grupo SETacumulado a gestação clínica acumulada foi calculada levando-se em consideração a segunda transferência para as pacientes que não tiveram sucesso na primeira tentativa da seguinte forma: [gestação clínica na primeira transferência + gestação clínica na segunda transferência * (1 –

gestação clínica na primeira transferência)). Este cálculo assume que não houve contraindicação para continuar a SET no segundo ciclo. A gestação múltipla acumulada para o grupo SETacumulado foi calculada por: [gestação múltipla na primeira transferência + gestação múltipla na segunda transferência * (1 – gestação clínica na primeira transferência)] (Luke et al., 2015).

Comparamos os resultados do grupo DET com o grupo SETacumulado (Tabela 5) e observamos taxas de gestação clínica semelhantes após a transferência de dois embriões.

Tabela 5: Resultados clínicos dos grupos DET e SETacumulado.

	DET	SETacumulado	P
Taxa de gestação bioquímica	63,5%	63,3%	0,948
Taxa de implantação	36,9%	47,2%	0,002
Taxa de aborto	18,3%	15,9%	0,566
Taxa de gestação clínica	46,6%	45,9%	0,898
Taxa de gestação múltipla	32,2%	6,1%	<0,001

Importante ressaltar as diferenças observadas nas taxas de gestação múltipla, uma vez que mesmo na transferência de um único o embrião o evento da divisão embrionária, gestação monozigótica, pode ocorrer. Assim, a Figura 5 mostra a taxa de gestação clínica por grupo, que foi semelhante e entre essas gestações positivas, as proporções de gestações únicas e múltiplas.

Figura 6: Gráfico representativo dos resultados de gestação clínica e gestação múltipla nos grupos DET e SETacumulado após a transferência de dois embriões.

A fim de avaliar os resultados clínicos ajustados para as variáveis possivelmente intervenientes, foi construído um modelo de regressão logística múltipla verificando a associação entre a gestação clínica acumulada e a transferência de dois embriões um a um (SET-SET) ou em uma única transferência (DET) ajustado para idade da mulher, dose de gonadotrofina administrada, número de embriões excedentes criopreservados e transferência de embriões descongelados. Foram avaliadas como variáveis dependentes a gestação clínica acumulada (Tabela 6) e gestação múltipla acumulada (Tabela 7).

Observamos que quando foi realizada a transferência de dois embriões em um único ciclo (DET) ou dois embriões um a um (SET-SET), não houve associação significativa com a chance de ocorrer uma gestação clínica ($p=0,152$; $OR=1,57$). Por outro lado, a chance de ocorrer uma gestação múltipla foi mais de oito vezes maior ($p=0,04$; $OR=8,6$) quando a transferência de dois embriões foi realizada em um mesmo ciclo (DET) em relação a transferência de dois embriões um a um (SET-SET).

Tabela 6: Análise de regressão logística múltipla avaliando a associação entre a transferência de dois embriões um a um (SET-SET) comparado a uma única transferência (DET) e a ocorrência de gestação clínica acumulada, ajustado para as variáveis possivelmente intervenientes.

	Coefficiente	Erro Padrão do Coeficiente	p	OR
Transferência de dois embriões um a um (SET-SET)	-0,451	0,314	0,151	0,637
Transferência de embriões descongelados no 1º ciclo	0,230	0,337	0,494	1,259
Idade da mulher (anos)	-0,026	0,037	0,482	0,974
Dose de gonadotrofina administrada (UI)	0,000	0,000	0,581	1,000
Número de embriões excedentes criopreservados	0,012	0,027	0,671	1,012
Transferência de embriões em estágio de blastocisto	-0,018	0,234	0,938	0,982
Constante	0,458	1,300	0,725	1,580

Tabela 7: Análise de regressão logística múltipla avaliando a associação entre a transferência de dois embriões um a um (SET-SET) comparado a uma única transferência (DET) e a ocorrência de gestação múltipla acumulada, ajustado para as variáveis possivelmente intervenientes.

	Coefficiente	Erro Padrão do Coeficiente	p	OR
Transferência de dois embriões um a um (SET-SET)	-2,122	1,048	0,043	0,120
Transferência de embriões descongelados no 1º ciclo	-0,130	0,536	0,808	0,878
Idade da mulher (anos)	-0,046	0,063	0,459	0,955
Dose de gonadotrofina administrada (UI)	0,000	0,000	0,724	1,000
Número de embriões excedentes criopreservados	0,018	0,044	0,686	1,018
Transferência de embriões em estágio de blastocisto	0,508	0,375	0,176	1,661
Constante	0,713	2,154	0,741	2,040

5 DISCUSSÃO

As técnicas de reprodução assistida estão associadas a potenciais riscos e complicações materno-fetais e neonatais. A ocorrência de gestações múltiplas se destaca, principalmente por estar diretamente relacionada ao número de embriões transferidos (Kallen et al., 2005a). As adversidades decorrentes de gestações múltiplas são bem conhecidas e compreendem riscos maternos e para o neonato (Zollner and Dietl, 2013; Chambers et al., 2014; Murray and Norman, 2014), bem como aumento significativo de custos por hospitalização nos primeiros cinco anos de vida (van Heesch et al., 2015). Diante disso, considerando as questões financeiras e expectativas dos casais em tratamento de infertilidade, esse trabalho visou demonstrar os benefícios da SET aplicada corretamente para a parcela de casais de bom prognóstico. Destacando-se a diminuição da incidência das complicações de uma possível gestação múltipla, sem haver comprometimento no sucesso do tratamento.

Demonstramos que dois ciclos de eSET são tão efetivos quanto DET quando comparadas as taxas de gestação, com significativa diminuição da ocorrência de gestação múltipla. Como preconizado pela Practice Committee of American Society for Reproductive (Practice Committee of American Society for Reproductive, 2012), sugere-se então que esse tipo de manejo das TRA permite manutenção na taxa de gravidez clínica, mas com significativa redução da incidência gestações múltiplas, diminuindo assim as possíveis complicações maternas e perinatais.

Por se tratar de um estudo retrospectivo, os dados das pacientes foram cuidadosamente analisados a fim de se limitar adequadamente cada um dos grupos de estudo, diminuindo possíveis interpretações enviesadas. Os grupos foram padronizados quanto ao tipo de fertilização dos embriões (ICSI), por ser procedimento padrão dos centros onde os dados foram coletados. A idade das pacientes selecionadas para o estudo também foi outro critério importante neste estudo. Ainda que tenham sido incluídas pacientes com até 38 anos, a idade média em ambos os grupos foi de 33 anos, indicando que a maioria das pacientes incluídas tinham menos

de 35 anos. Entretanto, a fim de eliminar qualquer dúvida sobre a influência da idade na taxa de gestação, essa variável foi incluída nas análises de regressão logística múltipla. Após esta análise, não foi observada influência da idade na ocorrência de gestação clínica ou múltipla em nenhum dos grupos de estudo.

Outros dados clínicos, como número de oócitos coletados, número de oócitos MII, taxa de fertilização e número de embriões criopreservados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos DET e SET. O mesmo ocorreu na avaliação dos fatores de infertilidade onde a maioria estava em proporções estatisticamente iguais em ambos os grupos. Como se trata de trabalho retrospectivo, fomos surpreendidos pela inclusão de uma paciente com falência ovariana no grupo SET. Entretanto, essa paciente cumpria os estritos critérios de inclusão definidos para o trabalho, tendo seus apenas 3 oócitos originando 3 embriões de boa qualidade. O fator anatômico foi mais frequente no grupo SET. Porém, como observado nos resultados clínicos, parece não ter afetado significativamente as taxas de gestação desse grupo. Os fatores agrupados no grupo “outros” tiveram maior frequência no grupo DET, mas sem influência estatística final. Vale ressaltar ainda que, embora tenham sido incluídas pacientes com endometriose em ambos os grupos, a frequência dessas pacientes foi estatisticamente igual, não influenciando os resultados finais obtidos.

Os dados levantados foram inicialmente comparados em quatro grupos: DET fresco, DET descongelado, SET fresco e SET descongelado. Observamos que DET descongelado apresentou maior taxa de beta-HCG positivo e de implantação quando comparado ao grupo fresco. Muito se discute acerca do uso de embriões frescos ou descongelados. Alguns estudos sugerem que em ciclos com transferência de embriões descongelados, o endométrio se mostra mais receptivo em decorrência da menor influência hormonal do estímulo ovariano prévio, devido ao aumento dos níveis de progesterona no final da fase folicular que pode impactar negativamente na receptividade endometrial (Horcajadas et al., 2005; Labarta et al., 2011). Já Haouzi e colaboradores sugerem que o aumento dos níveis de estradiol durante o estímulo ovariano possa alterar fatores angiogênicos do endométrio, bem como a receptividade embrionária (Haouzi et al., 2010). Porém, a despeito disso, neste estudo, essa

diferença não se refletiu em diferença significativa nas taxas de gestação clínica, portanto sem significado clínico relevante. Já os grupos SET não apresentaram diferenças entre o uso de embriões frescos ou descongelados. Diante da similaridade clínica entre os grupos fresco e descongelado as análises quanto à taxa de gestação única ou múltipla foram comparadas nos grupos SET e DET como um todo. Observamos, como esperado, maior taxa de gestação clínica e gestações múltiplas no grupo DET, sem haver diferenças entre as taxas de implantação e abortamento.

A fim de realizar uma avaliação ainda mais criteriosa entre os grupos, optamos por selecionar somente as pacientes que realizaram a transferência de blastocisto. Observamos o mesmo tipo de padrão para transferência de embriões frescos e congelados: maior número de testes de gravidez positivos (beta-HCG) e taxa de implantação no grupo DET descongelado quando comparado ao DET fresco e ausência de diferenças estatisticamente significantes no grupo SET. Os resultados observados para o primeiro ciclo, quando comparados os grupos DET e SET como um todo, também foram similares. O grupo DET apresentou maior taxa de gestações únicas e múltiplas, como esperado.

As pacientes que apresentaram falha em qualquer um dos ciclos DET ou SET não receberam nenhum tipo de avaliação adicional já que a falha de implantação caracteriza-se apenas após três falhas de FIV e a paciente deve ser reavaliada para possíveis intervenções antes de um novo ciclo. Além disso, exames e intervenções adicionais poderiam causar resultados enviesados, já que estas avaliações não seriam realizadas de forma padronizadas e homogêneas entre os grupos de estudo.

Em resumo, as análises pareadas de um ciclo de embrião único ou duplo demonstraram uma vantagem na utilização de dois embriões, quando o foco é simplesmente a ocorrência de gestação clínica. Entretanto, devido à grande ocorrência de gestações múltiplas nesse tipo de abordagem, deve-se considerar os fatores negativos envolvidos. A fim de demonstrar a vantagem do uso de SET, tanto na ocorrência de gravidez quanto na qualidade desta, comparamos os dados clínicos após a transferência de dois embriões no grupo DET, os quais foram transferidos em um único procedimento, com as pacientes receberam um embrião na primeira

transferência embrionária e um embrião na segunda transferência (para as que não engravidaram inicialmente), grupo SET acumulado.

Os resultados clínicos obtidos para DET e SET acumulado foram estatisticamente iguais quanto à taxa de gestação clínica, tanto nas comparações pareadas quanto nas análises de regressão logística ajustada para os possíveis fatores intervenientes, como: idade, número de embriões congelados, transferência de embriões descongelados, estágio do embrião na transferência e quantidade de gonadotrofina administrada. A análise de regressão demonstrou ainda que a chance de gestação múltipla em DET é oito vezes maior do que em dois ciclos de SET, demonstrando significativa desvantagem desse tipo de protocolo quando se consideram casais inférteis de bom prognóstico.

Ainda que a população de estudo (casais de bom prognóstico) incluía pacientes com fatores de infertilidade, de acordo com a classificação da *Society for Assisted Reproductive Medicine* (SART), estes não tiveram influência nos resultados obtidos, já que se apresentaram em proporções estatisticamente iguais nos dois grupos. Vale ressaltar que o estudo foi retrospectivo e o critério de seleção foi baseado na presença de pelo menos dois embriões de boa qualidade e de pelo menos um embrião criopreservado de boa qualidade com falha em no máximo um ciclo anterior de FIV e idade materna inferior a 38 anos.

Nenhuma das possíveis variáveis intervenientes apresentou associação estatisticamente significativa com a ocorrência de gestação clínica ou gestação múltipla. Um maior número de embriões congelados geralmente confere melhor prognóstico, porém essa variável também não interferiu nos resultados obtidos, já que não houve diferença estatística significativa entre os grupos DET e SET, nas análises pareadas. Não houve também relação com as taxas de gravidez clínica ou múltipla observadas, nas análises de regressão. Destacamos também que ainda que as pacientes do grupo DET tenham recebido uma dose de gonadotrofina estatisticamente maior do que o grupo SET, isso não se refletiu clinicamente, o que é comprovado nas análises de regressão logística, em que a dose de gonadotrofina não demonstrou influência estatisticamente significativa na taxa de gravidez clínica. Além disso, como a

dose de gonadotrofina é ajustada de acordo com a resposta da paciente, o número de óocitos obtidos foi similar, mesmo com doses maiores desta.

Apesar de termos observado diferença estatística significativa entre a taxa de implantação entre os grupos DET e SET acumulado, esta não possui significado clínico. A taxa de implantação no grupo SET acumulado se mostrou elevada porque foram considerados dois ciclos de SET. Assim, no primeiro ciclo, ainda que sem sucesso, consideramos a ocorrência de implantação, por exemplo nos casos de abortamento clínico. Isso é observado, pois a taxa de implantação no grupo SET acumulado é ligeiramente diferente da taxa de gravidez. Como o desfecho clínico principal é a ocorrência de gestação, essa pequena variação na implantação no grupo onde foram avaliados dois ciclos não tem relevância clínica.

As taxas de eSET nos Estados Unidos e América latina são menores do que em países que impõem restrições ao número de embriões transferidos e nos quais os tratamentos de reprodução assistida são financiados por verbas públicas, já que a tomada de decisão quanto ao número de embriões transferidos fica a cargo do médico e do casal (Maheshwari et al., 2011). A comprovação de que transferências sequenciais de embriões únicos possuem o mesmo sucesso da transferência de múltiplos embriões é argumento de grande peso para a tomada de decisão de médico e paciente. Os resultados deste trabalho demonstraram que o sucesso da reprodução assistida é o mesmo com transferências sequenciais de um único embrião e se compara à transferência simultânea de dois embriões.

A realização de dois ciclos de eSET ao invés de um DET não impacta significativamente na prática clínica, já que a taxa média de sucesso de tratamentos de FIV está em torno de 50% de gestação e 40% de nascidos vivos (Sunderam et al., 2017) e os tratamentos consecutivos são uma prática rotineira em clínicas de TRA independentemente do número de embriões transferidos, já que aproximadamente metade dos casais não alcançam sucesso na primeira tentativa. Além disso, se considerarmos o impacto financeiro, este é significativamente menor quando da realização de dois ciclos, comparando-se com custos decorrentes de gestações múltiplas nos períodos pré, peri e pós-natal, como evidenciado por levantamento

realizado nos Estados Unidos (Lemos et al., 2013). Portanto, sugere-se considerar que, apesar de a transferência de dois embriões levar a uma taxa de gestação ligeiramente maior e um tempo menor até a gestação clínica, o custo-benefício de duas transferências é mais significativo quando comparado ao de uma gestação múltipla decorrente de uma transferência dupla. Ainda que no Brasil, na maioria das vezes, esses custos não sejam arcados diretamente pelo próprio paciente, deve-se considerar que todos os gastos das gestações múltiplas e todos os custos que elas podem trazer com as complicações decorrentes são pagos pelos convênios médicos ou pela instituição governamental. Ao se pensar, por exemplo, em política de saúde pública e na possibilidade de fornecer tratamento de reprodução assistida a uma maior parte da população, esses dados são indicadores muito importantes na realização dos orçamentos.

A decisão em relação ao número de embriões em cada transferência foi feita em comum acordo entre médico e paciente, diante da apresentação das vantagens e desvantagens de cada um dos procedimentos. Rai e colaboradores demonstraram que médicos e pacientes não são favoráveis à gemelaridade, por achar que a transferência de um maior número de embriões seria mais profícua (Rai et al., 2011). A educação do paciente e maior clareza em relação à morbidade e mortalidade materna e neonatal decorrente das gestações gemelares, assim como os custos elevados destas intercorrências, seria efetiva em reduzir a preferência pela gestação múltipla entre os casais em tratamento (Murray et al., 2004; Hope and Rombauts, 2010).

Os resultados deste trabalho demonstram a grande vantagem da transferência sequencial de embrião único. Quando existe a opção para a seleção de embriões de boa qualidade, em casais inférteis de bom prognóstico, pode-se alcançar a mesma taxa de gravidez de uma transferência de dois embriões, reduzindo-se assim significativamente as complicações materno-fetais decorrentes de gestações múltiplas. É importante ressaltar ainda que duas transferências sequenciais de um único embrião têm relação custo-benefício melhor do que uma transferência de dois embriões, quando se leva em consideração os riscos materno-fetais e neonatais das gestações

múltiplas e os custos adicionais que elas podem gerar. Isso é ainda mais relevante nas análises de políticas de saúde pública em países em desenvolvimento como o Brasil.

6 CONCLUSÕES

1 - Os resultados deste estudo mostram que em população de bom prognóstico, as taxas de sucesso cumulativas da transferência eletiva de até dois embriões transferidos um a um é equivalente à taxa de sucesso da transferência eletiva de dois embriões em um único evento;

2 - As transferências eletivas de embriões a fresco e descongelados resultaram taxas de gestações clínicas semelhantes;

3 – De igual modo, as transferências eletivas de um blastocisto versus a de dois também apresentaram resultados semelhantes;

4 - As taxas de gestação múltipla foram significativamente menores quando foi realizada a transferência eletiva de até dois embriões transferidos um a um em comparação à transferência eletiva de dois embriões em um único evento.

7 ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Transferência eletiva de um ou dois embriões em ciclos de fertilização in vitro: Implicações nas taxas de sucesso e gestação múltipla

Pesquisador: Paulo Cesar Serafini

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 46806615.6.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.151.345

Data da Relatoria: 15/07/2015

Apresentação do Projeto:

A prevalência de infertilidade, em países em desenvolvimento, é estimada entre 8 a 12% dos casais, onde a infertilidade constitui um importante problema de saúde, e a demanda por tratamento tem aumentado decorrente da protelação da primeira gestação, aumento da incidência de doenças sexualmente transmissíveis, aumento dos índices de obesidade, e por maior aceitação dos pacientes em relação aos tratamentos disponíveis. Entretanto, como consequência da utilização das técnicas de fertilização in vitro (FIV), as taxas de gestação múltipla são altas, em torno de 20 a 25%, em consequência da estimulação ovariana associada à transferência de vários embriões. Os pesquisadores propõem estudo retrospectivo, baseado na coleta de dados de ciclos de fertilização in vitro realizados no período de janeiro de 2011 à dezembro de 2014, no Centro de Reprodução Humana Mário Covas. Será realizada a coleta de informações dos ciclos de fertilização in vitro a partir do banco de dados de pacientes que realizaram tratamento de infertilidade para obtenção de gestação no Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas, Divisão de Clínica Ginecológica do HC-FMUSP, para realização de tratamento no período de

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.151.345

janeiro de 2011 à dezembro de 2014. A hipótese é que a transferência eletiva de um embrião a fresco, seguida da transferência eletiva de um embrião criopreservado pode evitar a gestação múltipla. Entretanto, não há casuística brasileira demonstrando a efetividade desse protocolo de tratamento. Os resultados desta análise podem ser utilizados futuramente para o aconselhamento de pacientes a respeito da melhor estratégia de transferência de embriões, assim como para a educação médica em relação a utilização da transferência eletiva e embrião único com maior segurança.

Objetivo da Pesquisa:

GERAL: Comparar os resultados de ciclos de Fertilização In Vitro com transferência eletiva de um embrião a fresco seguida da transferência eletiva de um segundo embrião criopreservado nos casos em que a gestação não ocorrer, com a transferência eletiva de dois embriões a fresco. ESPECÍFICOS: 1.Avaliar a taxa de sucesso (gestação) no ciclo fresco com transferência eletiva de um ou dois embriões; 2.Avaliar a taxa de gestação cumulativa comparando o ciclo de transferência eletiva de dois embriões e de um embrião seguida da transferência eletiva de um segundo embrião criopreservado; 3.Avaliar a taxa de gestação múltipla comparando o ciclo de transferência eletiva de dois embriões e de um embrião seguida da transferência eletiva de um segundo embrião criopreservado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: os pesquisadores entendem que por ser estudo retrospectivo, baseado na coleta de dados a partir de prontuários de pacientes, não há riscos relacionados ao estudo. Entretanto, entende-se que toda pesquisa acarreta riscos, e, neste caso, os riscos referem-se à quebra de confidencialidade e privacidade dos dados dos participantes. Benefícios: não há benefício direto para o participante, já que trata-se de um estudo retrospectivo baseado na coleta de dados a partir de prontuários de pacientes. A partir dos resultados e conhecimentos obtidos, pacientes poderão ser beneficiadas no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa retrospectiva, com critérios de inclusão e exclusão bem definidos, e desfechos apresentados. Serão incluídas 440 participantes, conforme cálculo de tamanho de

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.151.345

amostra apresentado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores solicitam dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para esta pesquisa, por ser estudo retrospectivo de dados armazenados em prontuários. A comissão concorda com a dispensa.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 16 de Julho de 2015

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8 REFERÊNCIAS

Baruffi, R. L., A. L. Mauri, C. G. Petersen, A. Nicoletti, A. Pontes, J. B. Oliveira and J. G. Franco, Jr. (2009). "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 **7**: 36.

Chambers, G. M., V. P. Hoang, E. Lee, M. Hansen, E. A. Sullivan, C. Bower and M. Chapman (2014). "Hospital costs of multiple-birth and singleton-birth children during the first 5 years of life and the role of assisted reproductive technology." JAMA Pediatr **168**(11): 1045-1053.

Crawford, S., S. L. Boulet, A. S. Mneimneh, K. M. Perkins, D. J. Jamieson, Y. Zhang and D. M. Kissin (2016). "Costs of achieving live birth from assisted reproductive technology: a comparison of sequential single and double embryo transfer approaches." Fertil Steril **105**(2): 444-450.

Ezugwu, E. and S. V. der Burg (2015). "Debating Elective Single Embryo Transfer after in vitro Fertilization: A Plea for a Context-Sensitive Approach." Ann Med Health Sci Res **5**(1): 1-7.

Fujimoto, A., K. Morishima, M. Harada, T. Hirata, Y. Osuga and T. Fujii (2015). "Elective single-embryo transfer improves cumulative pregnancy outcome in young patients but not in women of advanced reproductive age." J Assist Reprod Genet **32**(12): 1773-1779.

Gardner, D. K., M. Lane, J. Stevens, T. Schlenker and W. B. Schoolcraft (2000). "Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer." Fertil Steril **73**(6): 1155-1158.

Haouzi, D., S. Assou, C. Dechanet, T. Anahory, H. Dechaud, J. De Vos and S. Hamamah (2010). "Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects." Biol Reprod **82**(4): 679-686.

Hope, N. and L. Rombauts (2010). "Can an educational DVD improve the acceptability of elective single embryo transfer? A randomized controlled study." Fertil Steril **94**(2): 489-495.

Horcajadas, J. A., A. Riesewijk, J. Polman, R. van Os, A. Pellicer, S. Mosselman and C. Simon (2005). "Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles." Mol Hum Reprod **11**(3): 195-205.

Kallen, B., O. Finnstrom, A. Lindam, E. Nilsson, K. G. Nygren and P. Otterblad Olausson (2010). "Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years." Hum Reprod **25**(4): 1026-1034.

Kallen, B., O. Finnstrom, K. G. Nygren and P. O. Olausson (2005a). "In vitro fertilization (IVF) in Sweden: infant outcome after different IVF fertilization methods." Fertil Steril **84**(3): 611-617.

Kallen, B., O. Finnstrom, K. G. Nygren and P. O. Olausson (2005b). "Temporal trends in multiple births after in vitro fertilisation in Sweden, 1982-2001: a register study." BMJ **331**(7513): 382-383.

Kissin, D. M., A. D. Kulkarni, V. A. Kushnir, D. J. Jamieson and A. R. T. S. S. G. National (2014). "Number of embryos transferred after in vitro fertilization and good perinatal outcome." Obstet Gynecol **123**(2 Pt 1): 239-247.

Klemetti, R., M. Gissler and E. Hemminki (2002). "Comparison of perinatal health of children born from IVF in Finland in the early and late 1990s." Hum Reprod **17**(8): 2192-2198.

Labarta, E., J. A. Martinez-Conejero, P. Alama, J. A. Horcajadas, A. Pellicer, C. Simon and E. Bosch (2011). "Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis." Hum Reprod **26**(7): 1813-1825.

Lemos, E. V., D. Zhang, B. J. Van Voorhis and X. H. Hu (2013). "Healthcare expenses associated with multiple vs singleton pregnancies in the United States." Am J Obstet Gynecol **209**(6): 586 e581-586 e511.

Luke, B., M. B. Brown, E. Wantman, J. E. Stern, V. L. Baker, E. Widra, C. C. Coddington, 3rd, W. E. Gibbons, B. J. Van Voorhis and G. D. Ball (2015). "Application of a validated prediction model

for in vitro fertilization: comparison of live birth rates and multiple birth rates with 1 embryo transferred over 2 cycles vs 2 embryos in 1 cycle." Am J Obstet Gynecol **212**(5): 676 e671-677.

Maheshwari, A., S. Griffiths and S. Bhattacharya (2011). "Global variations in the uptake of single embryo transfer." Hum Reprod Update **17**(1): 107-120.

McLernon, D. J., K. Harrild, C. Bergh, M. J. Davies, D. de Neubourg, J. C. Dumoulin, J. Gerris, J. A. Kremer, H. Martikainen, B. W. Mol, R. J. Norman, A. Thurin-Kjellberg, A. Tiitinen, A. P. van Montfoort, A. M. van Peperstraten, E. Van Royen and S. Bhattacharya (2010). "Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials." BMJ **341**: c6945.

Min, J. K., E. Hughes, D. Young, M. Gysler, R. Hemmings, A. P. Cheung, G. J. Goodrow, V. Senikas, B. C. Wong, S. Sierra, B. Carranza-Mamane, A. Case, C. Dwyer, J. Graham, J. Havelock, F. Lee, K. Liu, T. Vause, O. Joint Society of, F. Gynaecologists of Canada-Canadian and C. Andrology Society Clinical Practice Guidelines (2010). "Elective single embryo transfer following in vitro fertilization." J Obstet Gynaecol Can **32**(4): 363-377.

Murray, S., A. Shetty, A. Rattray, V. Taylor and S. Bhattacharya (2004). "A randomized comparison of alternative methods of information provision on the acceptability of elective single embryo transfer." Hum Reprod **19**(4): 911-916.

Murray, S. R. and J. E. Norman (2014). "Multiple pregnancies following assisted reproductive technologies--a happy consequence or double trouble?" Semin Fetal Neonatal Med **19**(4): 222-227.

Palermo, G., H. Joris, P. Devroey and A. C. Van Steirteghem (1992). "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte." Lancet **340**(8810): 17-18.

Practice Committee of American Society for Reproductive, M. (2012). "Multiple gestation associated with infertility therapy: an American Society for Reproductive Medicine Practice Committee opinion." Fertil Steril **97**(4): 825-834.

Rai, V., A. Betsworth, C. Beer, G. Ndukwe and C. Glazebrook (2011). "Comparing patients' and clinicians' perceptions of elective single embryo transfer using the attitudes to a twin IVF pregnancy scale (ATIPS)." J Assist Reprod Genet **28**(1): 65-72.

Steinberg, M. L., S. Boulet, D. Kissin, L. Warner and D. J. Jamieson (2013). "Elective single embryo transfer trends and predictors of a good perinatal outcome--United States, 1999 to 2010." Fertil Steril **99**(7): 1937-1943.

Sunderam, S., D. M. Kissin, S. B. Crawford, S. G. Folger, D. J. Jamieson, L. Warner and W. D. Barfield (2017). "Assisted Reproductive Technology Surveillance - United States, 2014." MMWR Surveill Summ **66**(6): 1-24.

van Heesch, M. M., J. L. Evers, M. A. van der Hoeven, J. C. Dumoulin, C. E. van Beijsterveldt, G. J. Bonsel, R. H. Dykgraaf, J. B. van Goudoever, C. Koopman-Esseboom, W. L. Nelen, K. Steiner, P. Tamminga, N. Tonch, H. L. Torrance and C. D. Dirksen (2015). "Hospital costs during the first 5 years of life for multiples compared with singletons born after IVF or ICSI." Hum Reprod.

Veeck, L. L. (1999). An atlas of human gametes and conceptuses : an illustrated reference for assisted reproductive technology. New York, Parthenon Pub. Group.

Zegers-Hochschild, F., J. E. Schwarze, J. A. Crosby, C. Musri, M. T. Urbina and R. Latin American Network of Assisted (2016). "Assisted reproductive techniques in Latin America: The Latin American Registry, 2013." JBRA Assist Reprod **20**(2): 49-58.

Zollner, U. and J. Dietl (2013). "Perinatal risks after IVF and ICSI." J Perinat Med **41**(1): 17-22.