

## ECLOSIÓ ASSISTIDA I MONOZIGOCITAT

Baltasar Gornals,\* Itziar Belil, Ramon Aurell, Anna Veiga, Pedro N. Barri

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus.  
Passeig de la Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona. Tel. 932 274 700. Fax 932 057 966. Adreça electrònica: [balgor@dexeus.com](mailto:balgor@dexeus.com).

### Resum

S'ha suggerit que la incidència de bessons monozigòtics (MZ) és més freqüent després d'un procés de fecundació *in vitro* (FIV) amb tècniques de micromanipulació. Aquest increment podria ser degut en part als tractaments estimuladors de l'ovulació amb gonadotropines emprats en aquests casos. Les tècniques d'*assisted hatching* (AH) o eclosió assistida, tècnica de micromanipulació dissenyada per a facilitar la sortida de l'embrió de la zona pel·lúcida (ZP) s'utilitzen per a incrementar la implantació embrionària. En el present estudi es van analitzar de forma retrospectiva els resultats obtinguts de la transferència d'embrions, en fresc o congelats, procedents de cicles FIV, i sotmesos a la tècnica d'*assisted hatching* per afinament de la ZP. Les transferències embrionàries es van realitzar tant el dia +3 com el dia +5 de cultiu embrionari. De les cent trenta-nou transferències realitzades es van aconseguir quaranta-cinc embarassos, vint-i-sis d'únics i divuit de múltiples. Només va obtenir-se un embaràs monozigòtic (2,2%), procedent d'un cicle de criotransferència. Aquest fet ens podria dur a pensar que a més de les tècniques de micromanipulació, els processos de congelació-descongelació amb l'exposició dels embrions a elevades concentracions de crioprotector i a molt baixes temperatures podrien afavorir la formació de monozigòtics, tot i que serien necessaris més estudis per a confirmar aquesta hipòtesi.

**Paraules clau** Bessons monozigòtics, fecundació *in vitro*, zona pel·lúcida, eclosió assistida.

### Abstract

**Assisted hatching and monozygosity** It has been suggested that monozygotic (MZ) twinning incidence is more frequent after *in vitro* fertilization cycles (FIV) with micromanipulation techniques. This increase might be in part due to ovulation induction treatments with gonadotrophins used in these cases. Assisted hatching technique (AH), a micromanipulation technique designed to facilitate the embryo to escape from the zona pellucida (ZP), is used to increase embryo implantation. In the present study, the results obtained from fresh or frozen-thawed embryo transfers, corresponding FIV cycles with assisted hatching thinning of the ZP, were retrospective analyzed. Embryo transfers were performed on day 3 or 5 of development. A total of 45 pregnancies were obtained from 139 embryo replacements, 26 singles and 18 multiples. Just one monozygotic twinning (2,2%) was obtained which proceeded from a cryotransfer cycle. It suggests us that not only micromanipulation techniques, but also frozen-thawed process with high level of cryoprotector exposition and very low temperatures could enhance monozygotic twinning. Further studies should be necessary in order to confirm this hypothesis.

**Key words** Monozygotic twinning, fertilization *in vitro*, zona pellucida, assisted hatching.

## INTRODUCCIÓ

Els bessons monozigòtics (MZ) resulten de la divisió d'un únic oòcit fertilitzat en dos embrions genèticament idèntics, i s'ha descrit que aquest fenomen ocorre en el 0,42% de tots els embarassos duts a terme (Bulmer, 1970). La gestació múltiple monozigòtica és un fet preocupant a causa de l'associació amb l'augment de la mortalitat i morbiditat a causa de la gestació

múltiple en general (Kiely, 1998; Guyer *et al.*, 1997; Pharoah *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 1995; Spellacy *et al.*, 1990) i a la gestació múltiple monozigòtica en particular. El risc de mortalitat perinatal dels bessons MZ s'ha descrit com a dues o tres vegades superior al risc dels bessons dizigòtics (DZ) (Kovacs *et al.*, 1989; Naeye *et al.*, 1978).

S'ha suggerit que la formació d'aquest tipus de bessons MZ és més freqüent després d'un procés de

**Taula 1** Cicles d'AH per afinament de ZP. Resultats clínics globals i en funció del dia de transferència.

	Total	D+3	D+5
Nombre de pacients	139	119	20
Mitjana edat (anys)	36,9 ± 3,8	37,4 ± 3,7	34,2 ± 3,4 <sup>a</sup>
Mitjana oòcits inseminats	9,7 ± 7,0	8,3 ± 5,5	17,9 ± 9,2
Fecundats <i>n</i> (%)	997 (74,0)	721 (72,9)	276 (77,0)
Nombre embrions evolutius <i>n</i> (%)	506 (50,7)	425 (58,9)	81 (29,3)
Mitjana embrions transferits	2,2 ± 0,6	2,3 ± 0,6	2,0 ± 0,5
Embaràs <i>n</i> (%)	45 (32,4)	35 (29,4)	10 (50,0) <sup>b</sup>
Taxa implantació (%)	20,0	16,8	42,5
Avortaments <i>n</i> (%)	15 (33,3)	12 (34,3)	3 (30,0)
Únics <i>n</i> (%)	26 (57,8)	23 (65,7)	3 (30,0)
Múltiples <i>n</i> (%)	18 (40,0)	11 (31,4)	7 (70,0)
Nombre monozigòtics (%)	1 (2,2)	1 (2,9)	0

<sup>a</sup>  $P < 0,05$  per al test *t* d'Student amb comparació de la mitjana d'edat de la transferència del dia +3 o +5 de desenvolupament.

<sup>b</sup> Test de Fisher no significatiu amb comparació de la taxa d'embaràs de la transferència del dia +3 o dia +5 de desenvolupament.

fecundació *in vitro* (FIV) (Edwards *et al.*, 1986) encara que la veritable incidència està emmascarada pels *transfers* de múltiples embrions i el bloqueig dels embrions en les primeres etapes del desenvolupament. Aquest fenomen està atribuït a un gran nombre de factors, incloent-hi el tractament inductor de l'ovulació amb gonadotropines, les condicions de cultiu *in vitro*, anomalies morfològiques de la zona pellúcida (ZP), la formació de múltiples cavitats en els blastocists, i l'obertura artificial de la zona pellúcida amb tècniques de micromanipulació (Aurell *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 1990; Edwards *et al.*, 1986; Yorich *et al.*, 1984).

La tècnica d'*assisted hatching* (AH) o eclosió assistida suposa la reducció del gruix o la perforació total de la ZP dels embrions mitjançant la manipulació mecànica, per acció de substàncies químiques o enzimàtiques, o per tecnologia làser. Aquestes tècniques han estat utilitzades durant els últims deu anys per a incrementar les taxes d'implantació embrionària, en els casos que poden estar associats amb un gruix o duresa anormal de la zona pellúcida d'alguns dels embrions fecundats *in vitro* (Nakayama *et al.*, 1998; Antinori *et al.*, 1996; Tucker *et al.*, 1991; Cohen, 1991).

Els estudis que avaluen l'efectivitat dels mètodes d'AH per a augmentar les taxes d'embaràs suggereixen que aquests procediments poden presentar un benefici per a determinats subgrups de pacients amb difícil tractament, com per exemple l'edat materna avançada o múltiples cicles errats (Meldrum *et al.*, 1998; Chao *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 1997; Schoolcraft *et al.*, 1995). No obstant això, s'han publicat una sèrie d'articles on es conclou que l'ús de les tècniques de l'*assisted hatching* impliquen un augment en les taxes de bessons monozigòtics (Yakin *et al.*, 2003; Sheen *et al.*, 2001;

Schieve *et al.*, 2000; Herslag *et al.*, 1999; Meldrum *et al.*, 1998).

En el present estudi es van analitzar de forma retrospectiva els resultats de cent trenta-nou cicles sotmesos a la tècnica d'*assisted hatching* per afinament de la ZP. Es va avaluar la taxa d'embaràs i d'implantació i la incidència de bessons monozigòtics.

## MATERIALS I MÈTODES

### *Pacients i període de l'estudi*

Un total de cent trenta-nou cicles de FIV amb AH van ser realitzats des del maig de 2002 fins al gener de 2005 en el Departament d'Obstetrícia i Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus. Les causes d'esterilitat van ser tant masculines com femenines, o bé sense causa aparent.

L'estimulació ovàrica es va aconseguir mitjançant un dels dos protocols: *a*) gonadotropines i agonistes, *b*) gonadotropines i antagonistes. La gonadotropina coriònica humana (HCG) va ser administrada a tots els pacients quan els oòcits complien els criteris de maduresa i la punció oocitària es realitzava per aspiració via transvaginal guiata per ultrasons trenta-sis hores després. En dos cicles de criotransferència el tractament va ser substituït amb gestàgens.

### *Inseminació i cultiu dels embrions*

La inseminació dels oòcits va realitzar-se mitjançant la fecundació *in vitro* convencional o bé FIV-ICSI, depenent de la qualitat espermàtica. Els espermatozoides

podien provenir tant de cònjuge com de donant (FIV-IAD) anònim. També s'han utilitzat espermatozoides testiculars obtinguts mitjançant aspiració (TESA) o mitjançant l'extracció testicular i posterior congelació (TESEC).

El cultiu dels gàmetes i embrions va ser amb el sistema de cultiu de Vitrolife (Gotheborg, Suècia) segons les indicacions del seu manual.

### ***Assisted hatching***

D'un total de 997 embrions obtinguts, 314 van ser micromanipulats per tal de fer l'*assisted hatching*. Es va fer servir un làser (Fertilase, Medical Technologies Montreux SA, Clarens, Suïssa) enganxat al microscopi invertit. L'embrió, subjectat per una pipeta Holding (Humagen, EUA), era exposat a l'acció fotolítica del làser en una regió de la ZP allunyada dels blastòmers. La ZP no va ser totalment disseccionada, només s'afinava el gruix de la zona emprant de dos a nou trets. La mesura del gruix de la ZP es va fer en quatre punts oposats. Així mateix, es va registrar la longitud de la zona afinada.

### ***Trànsfer dels embrions***

La transferència es va realitzar el dia 3 o 5 de desenvolupament, depenent de l'estat dels embrions i de la presència d'antecedents de mala implantació. L'AH dels embrions amb millor qualitat es realitzava com a mínim trenta minuts abans del *trànsfer*.

En dos casos la transferència es va fer amb embrions que havien estat criopreservats el dia +3 de cultiu. Es van descongelar el dia 16 del cicle endomètric de la pacient i es van transferir el dia següent.

Com a tractament de la fase lútea va administrar-se progesterona via vaginal des del dia del *trànsfer* (dos dies abans en el CT) i va continuar diàriament fins a la menstruació o fins a la setmana 10 de gestació.

L'embaràs clínic està definit com un embaràs intrauterí amb activitat cardíaca fetal, mentre que considerem com a embaràs monozigòtic aquells embarassos en què el nombre de batecs fetals observats amb ultrassò en una etapa primerenca excedeix el nombre d'embrions que han estat transferits o els signes ecogràfics indiquen que són monozigòtics.

## **RESULTATS**

L'edat mitjana ( $\pm$  SD) de totes les pacients analitzades durant el període de l'estudi va ser  $36,9 \pm 3,8$  anys. Les pacients havien estat sotmeses anteriorment a una mitjana de  $3,9 \pm 2,0$  *trànsfers* previs al present estudi.

Els oòcits van ser inseminats mitjançant la FIV convencional en vint-i-set cicles (semen procedent de la parella o banc de semen) o FIV-ICSI en cent set cicles (semen de la parella o testicular). Als cinc cicles restants es va fer servir la FIV combinant la inseminació convencional i ICSI.

Respecte a l'*assisted hatching*, la mitjana del gruix de les zones pellúcides afinades va ser de  $17,1 \pm 3,9$   $\mu\text{m}$ , i de l'espai afinat,  $47,6 \pm 11,1$   $\mu\text{m}$ . Es van disparar una mitjana de  $4,2 \pm 1,5$  trets de làser amb una durada de  $7,9 \pm 1,6$  ms. No van detectar-se diferències significatives quant al nombre i durada dels trets entre els embrions als quals es va fer el *hatching* el dia +3 o dia +5.

Pel que respecta als embarassos, vint-i-sis van ser únics i divuit múltiples, dels quals un va ser monozigòtic, procedent d'un cicle de criotransferència. La resta de resultats clínics globals i dels embrions transferits en el dia +3 o dia +5 s'observen a la taula 1.

## **DISCUSSIÓ**

Hi ha evidències que la inducció a l'ovulació mitjançant gonadotropines està associada amb un augment de la taxa de bessons monozigòtics fins a valors similars a l'1,5% (Derom *et al.*, 1987; Edwards *et al.*, 1986). Segons alguns autors, en realitzar FIV amb tècniques de micromanipulació, aquesta taxa varia entre 1,2-8,9% (Tarlitzis *et al.*, 2002; Abusheika *et al.*, 2000; Sills *et al.*, 2000; Herschlag *et al.*, 1999; Alikani *et al.*, 1994; Edwards *et al.*, 1986). En el present estudi la taxa de bessons monozigòtics obtinguda és del 2,2%, amb la qual cosa està compresa dins dels valors publicats.

La finalitat de l'afinament de la zona pellúcida per làser (*assisted hatching thinning*) és facilitar l'eclosió o *hatching* de l'embrió i així afavorir la implantació en aquelles pacients amb problemes previs d'implantació. Sembla ser que l'estructura de la ZP pot alterar-se amb el làser i es provoca un enduriment d'aquesta. Aquest enduriment podria ser el responsable d'una mala eclosió de l'embrió, amb una escissió de la massa celular interna i la conseqüent divisió de l'embrió, que dona lloc a dos embrions idèntics, és a dir, monozigòtics.

Cal destacar que l'únic bessó monozigòtic obtingut provenia d'un dels dos *criotransfers* realitzats. Aquest fet ens podria dur a pensar que, a més de les tècniques de micromanipulació, els processos de congelació-descongelació amb exposició dels embrions a elevades concentracions de crioprotector i baixes temperatures podrien afavorir un augment en la taxa de monozigocitat, probablement a causa de possibles canvis en l'estructura de la ZP que podrien provocar un enduri-

ment. Seria interessant iniciar una nova via d'estudi per determinar si els protocols de congelació i descongelació influeixen sobre la taxa de monozigocitat.

Tenint en compte la baixa incidència de la monozigocitat, per tal d'obtenir resultats més conclouents, seria aconsellable recollir dades de sèries més àmplies mitjançant estudis multicèntrics, i analitzar de forma homogènia les diferents tècniques aplicades.

## BIBLIOGRAFIA

- ABUSHEIKHA, N.; SALHA, O.; SHARMA, V.; BRINDEN, P. (2000). «Monozygotic twinning and IVF/ICSI treatment: a report of 11 cases and review of literature». *Hum. Reprod. Update.*, 6(4):396-403. Erratum in: *Hum. Reprod. Update* (2000) 6(6):621.
- ALKANI, M.; NOYES, N.; COHEN, J.; ROSENWAKS, Z. (1994). «Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture». *Hum. Reprod.*, 9:1318-1321.
- ANTINORI, S.; SELMAN, H. A.; CAFFA, B.; PANCI, C.; DANI, G. L.; VERSACI, C. (1996). «Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy». *Hum. Reprod.*, 11:2488-2492.
- AURELL, R.; BELIL, I.; VEIGA, A.; BARRI, P. N. (2004). «Micromanipulation and the risk of multiple pregnancy». *Multiple pregnancy. Epidemiology, gestational and perinatal outcome*. Cap. 78: 1-5. Lancaster (RU): Parthenon.
- BULMER, M. G. (1970). *The biology of twinning in man*. Oxford: Clarendon Press.
- CHAO, K. H.; CHEN, S. U.; CHEN, H. F.; WU, M. Y.; YANG, Y. S.; HO, H. N. (1997). «Assisted hatching increases the implantation and pregnancy rate of in vitro fertilization (IVF) embryo transfer (ET), but not that of IVF-tubal ET in patients with repeated IVF failures». *Fertil. Steril.*, 67:904-908.
- COHEN, J.; ELSNER, C.; KORT, H.; MALTER, H.; MASSEY, J.; MAYER, M. P.; WEIMER, K. (1990). «Impairment of hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation». *Hum. Rep.*, 5:7-13.
- COHEN, J. (1991). «Assisted hatching of human embryos». *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.*, 8:179-190.
- DEROM, C.; VLIETNCK, R.; DEROM, R. [*et al.*](1987). «Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction». *Lancet*, 1(8544):12366-1238.
- EDWARDS, R. G.; METTLER, L.; WALTERS, D. E. (1986). «Identical twins and in vitro fertilization». *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer*, 3:114-117.
- GARDNER, M. O.; GOLDENBERG, R. L.; CLIVER, S. P.; TUCKER, J. M.; NELSON, K. G.; COPPER, R. L. (1995). «The origin and outcome of preterm twin pregnancies». *Obstet. Gynecol.*, 85:553-557.
- GUYER, B.; MARTIN, J. A.; MACDORMAN, M. F.; ANDERSON, R. N.; STROBINO, D. M. (1997). «Annual summary of vital statistics 1996». *Pediatrics*, 100:905-918.
- HERSLAG, A.; PAINE, T.; COOPER, G. W.; SCHOLL, G. M.; RAWLINSON, K.; KVAPIL, G. (1999). «Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching». *Fertil. Steril.*, 71:144-146.
- KIELY, J. L. (1998). «What is the population-based risk of preterm birth among twins and other multiples?». *Clin. Obstet. Gynecol.*, 41:3-11.
- KOVACS, B. W.; KIRSCHBAUM, T. H.; PAUL, R. H. (1989). «Twin gestations. I. Antenatal care and complications». *Obstet. Gynecol.*, 74:313-317.
- MELDRUM, R. D.; WISOT, A.; YEE, B.; GARZO, G.; YEO, L.; HAMILTON, F. (1998). «Assisted hatching reduces the age-related decline in IVF outcome in women younger than age 43 without increasing miscarriage or monozygotic twins». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 15:418-421.
- NAEYE, R. L.; TAFARI, N.; JUDGE, D.; MARBOE, C. C. (1978). «Twins: causes of perinatal death in 12 United States cities and one African city». *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 131:267-272.
- NAKAYAMA, T.; FUJIWARA, H.; TASTUMI, K.; FUJITA, K.; HIGUCHI, T.; MORI, T. (1998). «A new assisted hatching technique using a piezo-micromanipulator». *Fertil. Steril.*, 69:784-788.
- PHAROAH, P. O. D.; COOKE, T. (1996). «Cerebral palsy and multiple births». *Arch. Dis. Child.*, 75:F174-177.
- SCHIEVE, L. A.; MEIKLE, S. F.; PETERSON, H. B.; JENG, G.; BURNETT, N. M.; WILCOX, L. S. (2000). «Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through in vitro fertilization?». *Fertil. Steril.*, 74:288-294.
- SCHOOLCRAFT, W. B.; SCHLENKER, T.; JONES, G. S.; JONES, H. W. (1995). «In vitro fertilization in women age 40 and older: the impact of assisted hatching». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12:581-584.
- SHEEN, T. C.; CHEN, S. R.; AU, H. K.; CHIEN, Y. Y.; TZENG, C. R. (2001). «Herniated blastomere following chemically assisted hatching may result in monozygotic twins». *Fertil. Steril.*, 74:946-952.
- SILLS, E. S.; MOOMJY, M.; ZANINOVIC, N.; VEECK, L. L.; MC GEE, M.; PALERMO, G. D.; ROSENWAKS, Z. (2000). «Human zona pellucida micromanipulation and monozygotic twinning frequency after IVF». *Hum. Reprod.*, 15:890-895.
- SPELLACY, W. N.; HANDLER, A.; FERRE, C. D. (1990). «A case-control study of 1253 twin pregnancies from a 1982-1987 perinatal data base». *Obstet. Gynecol.*, 75:168-171.
- TAO, J.; TAMIS, R. (1997). «Application of assisted hatching for 2-day-old, frozen-thawed embryo transfer in a poor-prognosis population». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 14:128-130.
- TARLATZIS, B. C.; QUBLAN, H. S.; SANOPOULOU, T.; ZEPERIDIS, L.; GRIMBIZIS, G.; BONTIS, J. (2002). «Increase in the monozygotic twinning rate after intracytoplasmic sperm injection and blastocyst stage embryo transfer». *Fertil. Steril.*, 77(1):196-198.
- TUCKER, M. J.; COHEN, J.; MASSEY, J. B.; MAYER, M. P.;

- WIKER, S. R.; WRIGHT, G. (1991). «Partial dissection of the zona pellucida of frozen-thawed human embryos may enhance blastocyst hatching, implantation, and pregnancy rates». *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 165:341-345.
- YAKIN, K.; BALABAN, B.; URMAN, B. (2003). «Risks of monochorionic pregnancies after assisted hatching?» *Fertil. Steril.*, 79:1044-1046.
- YORICH, J. L.; STRANGER, J. D.; GRAUAUG, A.; LUNAY, G.; DAWKINS, R. L.; MULCAHY, M. T. (1984). «Monozygotic twins from in vitro fertilization». *Fertil. Steril.*, 41:833-837.