



ORIGINAL

Láser *assisted hatching* afinamiento (LAHA) en ciclos de fecundación *in vitro* en 2 grupos de edades



Beatriz Amoroch^{a,*}, Marta Mollá^a, David Gumbao^a, Julián Marcos^a,
Ana Sánchez^a, Laura Fernández^a, María Nicolás^a, José Landeras^a y Gloria Calderón^b

^a Instituto Valenciano de Infertilidad, Murcia, España

^b EmbryoTools S.L., Barcelona, España

Recibido el 28 de abril de 2016; aceptado el 7 de julio de 2016

Disponible en Internet el 20 de septiembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Láser *assisted hatching*;
Láser *assisted hatching* por afinamiento;
Zona pelúcida;
Tasa de implantación

Resumen El objetivo de este estudio retrospectivo fue valorar el efecto del láser *assisted hatching* por Afinamiento (LAHA) según los resultados obtenidos en tasa de gestación, implantación y aborto. El estudio se realizó en 2 grupos de pacientes sometidas a tratamientos de FIV/ICSI según su edad.

Se analizaron 308 ciclos FIV/ICSI realizados en mujeres con 38 o más años, que de forma aleatoria fueron distribuidas en 2 grupos: A) 154 ciclos donde no se realizó LAHA (grupo no LAHA); B) los 154 ciclos restantes en el que todos los preembriones transferidos fueron sometidos a LAHA (grupo LAHA). Estos 2 grupos a su vez se subdividieron en 4 subgrupos según edad: no LAHA 38 y 39 años, LAHA 38 y 39 años, no LAHA ≥ 40 años y LAHA ≥ 40 años.

Los resultados globales indican la tasa de gestación e implantación del grupo no LAHA vs LAHA: 29,9 vs 37,7%, $p=0,185$; 19,6 vs 27,1%, $p=0,051$ respectivamente. En los resultados por grupos de edades encontramos diferencias significativas en tasas de gestación e implantación en los grupos de 38 y 39 años no LAHA y con LAHA: 32,1 vs 46,9%, $p=0,033$; 20,8 vs 35,0%, $p=0,004$ respectivamente.

Este estudio revela la efectividad de la técnica LAHA en mujeres pertenecientes al grupo de pacientes con 38 y 39 años, mostrando mejores resultados en tasas de gestación/implantación.

A partir de 40 años no encontramos efecto beneficioso de LAHA aislado (sin DGP) y puede ser debido a la presencia de anomalías cromosómicas preembrionarias en este grupo de pacientes.

© 2016 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: beatriz.amoroch@ivi.es, bamoroch@hotmail.com (B. Amoroch).

KEYWORDS

Laser assisted hatching;
Laser assisted hatching by thinning;
Zona pelúcida;
Implantation rate

Laser assisted hatching tuning (LAHT) in cycles of in vitro fertilization in two age groups

Abstract A retrospective study was conducted to evaluate the effect of the Laser Assisted Hatching by Thinning (LAHT) according to the results of the pregnancy rate, implantation rate and miscarriage rate. The study was carried out with two groups of patients who had undergone treatment by IVF/ICSI and according to patient age.

A total of 308 cycles were performed on women of 38 years or more, randomly divided in two groups; group A: 154 cycles without LAHT (No-LAHT), and group B: the remaining 154 cycles in which all pre-embryos were transferred were subjected to LAHT. These two groups in turn were further subdivided into 4 groups according to the age: No- LAHT 38 and 39 years, LAHT 38 and 39 years, No-LAHT ≥ 40 years, and LAHT ≥ 40 years.

The overall results showed pregnancy and implantation rates of No-LAHT vs LAHT (29.9 versus 37.7%, $P = .185$; 19.6 versus 27.1%, $P = .051$ respectively. The results by age group showed significant differences in pregnancy and implantation rates in 38 and 39 years No-LAHT and LAHT groups: 32.1 versus 46.9%, $P = .033$; 20.8 vs 35.0%, $P = .004$, respectively.

This study shows the effectiveness of the LAHT technique in women of the 38 and 39 years group of patients, showing the best results in pregnancy and implantation rates.

No beneficial effect of isolated LAHT (no PGD) was found from greater than 40 years, which could be due to the presence of embryonic chromosomal abnormalities in this patient group.

© 2016 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El *assisted hatching* (AH) fue introducido por Cohen en 1990, quien propuso la técnica como parte de una solución a los problemas de la implantación preembrionaria (Cohen et al., 1990). Este mismo grupo desarrolla inicialmente en 1989 la disección parcial de la zona pelúcida (PZD), técnica para facilitar la penetración espermática en el ovocito a través de un orificio realizado en la zona pelúcida ovocitaria de forma mecánica (Cohen et al., 1989a,b). Al encontrar superiores tasas de implantación en los ovocitos sometidos a PZD, llegaron a la conclusión de que al hacer el agujero de forma mecánica en la zona pelúcida preembrionaria se podía favorecer la eclosión de los blastocistos, aumentando de esta forma las tasas de embarazo e implantación. Este proceso fue llamado técnica de eclosión asistida o AH (Cohen et al., 1990).

Cohen y su grupo consideran que las posibles causas de fallo de implantación en líneas generales son: 1) el ambiente folicular y la receptividad endometrial; 2) las condiciones de cultivo a las que los gametos y preembriones están expuestos; 3) el procedimiento de la transferencia; y 4) anomalías genéticas.

Sugieren una quinta causa, que es la imposibilidad del preembrión para realizar la eclosión de la zona pelúcida de manera natural, a pesar de la buena morfología preembrionaria.

Se sabe que el AH está indicado en pacientes de peor pronóstico reproductivo, como pueden ser aquellas pacientes que pertenecen al grupo de fallo de implantación (Magli et al., 1998; Primi et al., 2004) pacientes de edad avanzada (Cohen et al., 1992; Schoolcraft et al., 1994; Schoolcraft et al., 1995; Montag y Van der ven, 1999; Ghobara et al.,

2006) y en preembriones criopreservados (Gabrielsen et al., 2006; Ge et al., 2008; Ng et al., 2008).

Durante las 2 décadas pasadas se han utilizado diferentes métodos para la manipulación de la zona pelúcida en mujeres a partir de los 35 años (Balaban et al., 2002). Sin embargo, no existe consenso acerca de la efectividad de las técnicas de AH en preembriones que provienen de mujeres en edad reproductiva avanzada. El metaanálisis sobre el impacto del AH con diferentes técnicas (Edi-Osaghie et al., 2003) indica la probabilidad de la mejora del AH en mujeres de edad materna avanzada. Otras revisiones sistemáticas (Das et al., 2009; Martins et al., 2011) sobre 28 estudios cada una revelan que hay evidencias donde el AH puede incrementar las tasas de éxito en mujeres con fallo de implantación y probablemente en edad avanzada, pero se deben estudiar más las tasas de embarazo múltiple.

Parece ser que tanto la edad avanzada como el cultivo *in vitro* de los preembriones puede causar un endurecimiento de la zona pelúcida, haciendo necesaria la aplicación de las técnicas de AH para facilitar la eclosión de los blastocistos, aumentando de este modo las tasas de embarazo e implantación (Magli et al., 1998).

Varias metodologías se han desarrollado para mejorar el potencial del *hatching* de los blastocistos como PZD (Cohen et al., 1990), adelgazamiento de la zona pelúcida con medio ácido (tyrode) (Cohen et al., 1990), con medio químico (Fong et al., 1998) y láser con sus 2 variantes, la primera, Láser AH total (LAH) (Strohmer y Feichtinger, 1992) y láser AH *thinning*/afinamiento (LAHA) (Antinori et al., 1996a,b).

Dentro de la modalidad del láser se describe LAH total, que consiste en la creación de un agujero, perforando la zona pelúcida (20-30 μm), en su totalidad (Strohmer y

Feichtinger, 1992) y en 1996 Antinori et al., publican los primeros trabajos donde realiza un pequeño afinamiento de la zona pelúcida preembrionaria de forma parcial (LAHA).

Los motivos por los cuales se usa más el láser son seguridad y rapidez, además de porque el sistema es más reproducible, técnicamente más fácil de controlar y de usar comparado con las otras metodologías. Su aplicación está asociada con un incremento de forma significativa en las tasas de gestación e implantación en mujeres con fallo de implantación (Antinori et al., 1996a,b), pacientes con edad materna avanzada (Montag y Van der ven, 1999) y criotransferencias (Ng et al., 2008).

Los primeros estudios publicados utilizando láser en preembriones de ratón demuestran el aumento en las tasas de implantación (Tadir et al., 1991; Khalifa et al., 1992; Germond et al., 1995). Schiewe et al., 1995 demostraron con sus experimentos en ratones que la tasa blastocisto se incrementaba en un 57% en los preembriones en los que se realizaba LAH frente a los que no se realizaba (32%). Las tasas de implantación no se vieron afectadas por la realización de la eclosión asistida mediante láser.

En pre-embriónes humanos Strohmer y Feichtinger, 1992 fueron unos de los pioneros en desarrollar la técnica LAH total, obteniendo tasas de gestación del 40% vs 16,2% perteneciente al grupo control en pacientes con fallos previos de implantación.

Inicialmente este estudio estaba diseñado para realizar LAH total a los preembriones con creación de agujero perforando la zona pelúcida preembrionaria, pero debido a los estudios publicados de LAHA (Antinori et al., 1996a; Baruffi et al., 2000; Petersen et al., 2002; Ghobara et al., 2006) se tomó la decisión de realizar afinamiento de la zona pelúcida a los preembriones antes de ser transferidos al útero materno.

El objetivo del presente estudio fue valorar de una forma retrospectiva la efectividad del LAHA en función de las tasas de gestación, implantación y aborto en mujeres de 38-39 años y mayores de 39 años en ciclos de FIV/ICSI.

Material y métodos

Pacientes

El presente estudio retrospectivo fue realizado desde marzo de 2006 hasta diciembre de 2012 en el IVI Murcia.

Se seleccionaron 154 pacientes de la base de datos clínica (fig. 1) que cumplían los criterios de selección cuyos preembriones habían sido sometidos a LAH (grupo A: LAHA).

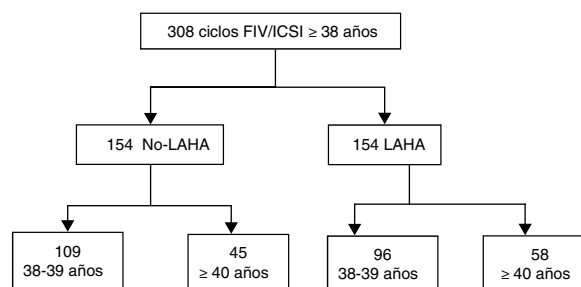


Figura 1 Grupos de estudio no-LAHA vs LAHA y edad.

Se seleccionó un total de 154 pacientes mediante un muestreo aleatorio sobre 892 pacientes que cumplían los criterios de selección, pero cuyos preembriones no habían sido sometidos a LAH (grupo B: no LAHA) para el grupo control.

A su vez, estos 2 grupos se subdividieron en grupos por edades:

- Pacientes con 38 y 39 años, a cuyos preembriones no se les realizó el LAHA: no LAHA 38 y 39 años.
- Pacientes que tienen 38 y 39 años, pero a los que sí se les realizó LAHA: LAHA 38 y 39 años.
- Pacientes con edad mayor o igual a 40 años sin LAHA: no LAHA ≥ 40 años.
- Pacientes con edad mayor o igual a 40 años con LAHA: LAHA ≥ 40 años.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Científica del Hospital General Universitario José María Morales Meseguer de Murcia.

A cada uno de los preembriones a transferir en el día 3 de desarrollo se le realizó un afinamiento de la zona pelúcida usando el sistema OCTAX Laser Shot (MTG-OCTAX, Alemania) cuando les correspondía el LAHA.

Los grupos fueron homogéneos en cuanto a edad, etiología, calidad preembrionaria y número de preembriones transferidos/ciclo (tabla 1).

Las pacientes fueron estimuladas de acuerdo a varios protocolos de estimulación, comúnmente utilizados en tratamientos de reproducción asistida (Escudero et al., 2004; García-Velasco et al., 2011).

Cuando al menos 2 folículos alcanzaron un diámetro > 17 mm se administró la HCG Ovitrelle (Merck Serono, Londres, Reino Unido) y 36 h más tarde, las pacientes se sometieron a la aspiración folicular para la obtención de los ovocitos.

El día 1 de desarrollo preembrionario se valoró la fecundación. Los cigotos correctamente fecundados se cambiaron a microgotas de medio de cultivo Global (LGGG, Life Global, Conneticut, EE. UU.), suplementado con 10% LG Protein Supplement (LGPS, Life Global, Conneticut, EE. UU.) cubiertas con aceite Paraffin Oil P.G. (LGPO-500, Life Global Conneticut, EE. UU.) en placas Falcon 351008 (EMB, Barcelona, España) previamente equilibradas desde el día anterior.

A las 48 h post FIV/ICSI los pre-embriónes fueron valorados según el número de células, el porcentaje de fragmentación, la simetría, las vacuolas, la multinucleación, siguiendo la clasificación de ASEBIR (Asociación Española de Biología de la Reproducción, 2007), tanto en día 2 como en día 3 de desarrollo preembrionario.

El grupo control, no LAHA, consta de 257 preembriones y 255 preembriones pertenecían al grupo LAHA.

En día 3 de desarrollo preembrionario los preembriones fueron valorados y seleccionados para hacer la transferencia preembrionaria, siguiendo la clasificación preembrionaria de ASEBIR. Los preembriones sobrantes de buena calidad fueron congelados o vitrificados ese mismo día. Los preembriones no aptos para ser criopreservados en el día 3 fueron cultivados hasta día el 5-6 de desarrollo, siendo criopreservados dependiendo de su morfología.

Tabla 1 Características generales: edad, etiología y calidad preembrionaria

	No LAHA	No LAHA	LAHA	LAHA
<i>Ciclos</i>	109	45	96	58
<i>Edad de las pacientes</i>	38-39	40-41-42	38-39	40-41-42
<i>Etiología</i>				
Masculina (%)	52 (47,8)	15 (33,3)	50 (52,0)	23 (39,7)
Femenina (%)	24 (22,0)	14 (31,1)	38 (39,6)	12 (20,7)
Masculina y femenina (%)	20 (18,3)	12 (26,7)	6 (6,3)	17 (29,3)
Idiopática (%)	13 (11,9)	4 (8,9)	2 (2,1)	6 (10,3)
<i>Calidad preembrionaria</i>				
Tipo A (%)	152 (79,2)	35 (47,9)	105(64,4)	50 (50,0)
Tipo B (%)	20 (10,4)	25 (34,3)	32 (19,6)	32 (32,0)
Tipo C (%)	20 (10,4)	13 (17,8)	26 (16,0)	18 (18,0)
Media preembriones transferidos	1,60	1,70	1,77	1,70

Técnica de láser *assisted hatching* afinamiento

Los preembriones seleccionados para LAHA fueron trasladados al microscopio invertido Eclipse TE 300 (Nikon Instrument, NY, EE. UU.), con una óptica de Hoffman, provisto de una placa calefactora Linkan THN 60-10 (Alemania), al cual ha sido adaptado el sistema OCTAX Laser Shot (MTG-OCTAX, Alemania) (fig. 2).

Utilizando el objetivo de 40× se realiza el afinamiento de la zona pelúcida con un tiempo de exposición entre 1,5-1,9 ms, y 7-9 disparos consecutivos coincidiendo con un 25% del total de la zona pelúcida preembrionaria desde la posición inicial a las 12:00 horarias hasta las 3:00 (Mantoudis et al., 2001; Ghobara et al., 2006) (fig. 3).

Llegado el momento de la transferencia, los preembriones de día 3 seleccionados para la misma fueron cargados en el catéter de transferencia (Wallace 1816N, Wallace Catheter, Smith-Medical, Brisbane, Australia). Todas las transferencias se realizaron bajo control ecográfico.

Ninguno de los preembriones seleccionados para criopreservación fueron sometidos a LAHA.

**Figura 2** Preembrión antes de LAHA.**Figura 3** Preembrión post LAHA, señalado con flechas.

Catorce días después de la transferencia se realizó la determinación de BHCG en suero, considerando positivo cuando fue superior a 25 IU.

Transcurridos 10 días tras la BHCG positiva se practicó una ecografía vaginal para valorar la presencia saco y latido cardíaco fetal.

La implantación fue calculada como la ratio de sacos gestacionales determinados por ultrasonido en relación con el número total de preembriones transferidos.

El aborto fue definido como una pérdida del embarazo durante las primeras 12 semanas de gestación, detectado previamente por ultrasonido.

Resultados

La [tabla 2](#) resume los resultados totales del estudio retrospectivo de tasas de gestación, implantación, aborto, recién nacido vivo (RNV) y gestaciones gemelares de las 308 pacientes que se sometieron a ciclos FIV/ICSI con 38 años o más con y sin LAHA.

En estos resultados globales no se encuentran diferencias estadísticamente significativas, pero se observa que en la

Tabla 2 Resultados globales de No LAHA y LAHA en mujeres ≥ 38 años

	No LAHA	LAHA	Valor de p	Odds ratio	IC
Ciclos	154	154			
T. gestación	29,9%	37,7%	0,185	0,706	(0,426-1,164)
	46/154	58/154			
T. implantación	19,6%	27,1%	0,051	0,661	(0,429-1,012)
Sacos/preembriones	52/265	71/262			
T. aborto	26,1%	31,0%	0,665	0,786	(0,299-2,011)
	12/46	18/58			
RNV	23,3%	31,8%	0,126	0,655	(0,382-1,115)
	36/154	49/154			
Gestación gemelar	6,5%	15,5%	0,219	0,383	(0,063-1,665)
	3/46	9/58			
Media de preembriones transferidos	1,72	1,71			

Tabla 3 Resultados por grupos de pacientes con 38 y 39 años no LAHA y LAHA

	No LAHA	LAHA	Valor de p	Odds ratio	IC
Ciclos	109	96			
T. gestación	32,1%	46,9%	0,033*	0,538	(0,292-0,983)
	35/109	45/96			
T. implantación	20,8%	35,0%	0,004*	0,490	(0,296-0,808)
Sacos/preembriones	40/192	57/163			
T. aborto	20,0%	26,7%	0,600	0,691	(0,201-2,216)
	7/35	12/45			
RNV	26,7%	42,7%	0,018*	0,488	(0,259-0,910)
	29/109	41/96			
Gestación gemelar	5,7%	17,7%	0,173	0,284	(0,028-1,567)
	2/35	8/45			
Media de preembriones transferidos	1,77	1,70			

* $p < 0,05$.

tasa de implantación hay una tendencia a favor del grupo de LAHA.

La [tabla 3](#) refleja los resultados de las pacientes que pertenecen al grupo de edad de 38 y 39 años sin y con LAHA.

Cuando comparamos los resultados obtenidos en cuanto a tasas de embarazo e implantación entre los grupos LAHA 38-39 años y no LAHA, se observan diferencias significativas (46,9% vs 32,1%, $p = 0,033$; IC 95% [0,292-0,983]), [35,0% vs 20,8%, $p = 0,004$; IC 95% [0,296-0,808]] a favor del grupo LAHA 38-39.

Se observó el mismo fenómeno cuando se compararon las tasas de RNV entre los 2 grupos (42,7% vs 26,7%, $p = 0,018$; IC 95% [0,259-0,910])

Cuando se refiere a las tasas de aborto en estos 2 grupos de pacientes no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados de las pacientes mayores o iguales a 40 años sin LAHA y con LAHA se muestran en la [tabla 4](#), siendo similares en tasas de gestación, implantación y aborto siendo: 24,4%, 16,4% y 45,4% vs 22,4%, 14,0% y 46,2% respectivamente.

Al analizar la tasa de embarazo gemelar no se encontraron diferencias significativas entre los grupos LAHA 38 y 39 (17,7%) y no LAHA (5,7%).

Discusión

El diseño del estudio fue creado para analizar si las tasas de gestación/implantación aumentaban en las mujeres que se sometían a ciclos de FIV/ICSI con edad avanzada, cuando se realizaba LAHA a los preembriones transferidos.

Para precisar los resultados decidimos dividir el grupo global en 38 y 39 años con y sin LAHA, llamando la atención el aumento de las tasas de gestación y de implantación con LAHA en el grupo de pacientes.

Este estudio es original frente a otros estudios realizados, puesto que los diferentes autores aportan datos globales en 2 grupos analizados, mientras que en este estudio se analizan los resultados en 2 grupos de edades a partir de 38 años, observando una mejora en los resultados de gestación e implantación en el grupo 38-39 años cuando la técnica LAHA era aplicada.

En la actualidad existen muchos estudios refiriéndose a la técnica de AH en fallos de implantación ([Magli et al., 1998](#); [Primi et al., 2004](#)) y preembriones criopreservados ([Gabrielsen et al., 2006](#); [Ng et al., 2008](#)).

Los estudios encontrados dentro del grupo de 38 años o más, al igual que con las otras indicaciones anteriores, refieren diferentes modalidades empleadas para la

Tabla 4 Resultados por grupos de pacientes con 40 y más años no LAHA y LAHA

	No LAHA	LAHA	Valor de p	Odds ratio	IC
Ciclos	45	58			
T. gestación	24,4% 11/45	22,4% 13/58	0,819	1,119	(0,400-3,090)
T. implantación	16,4% 12/73	14,0% 14/100	0,672	1,207	(0,474-3,034)
Sacos/preembriones					
T. aborto	45,4% 5/11	46,2% 6/13	1,000	0,973	(0,146-6,395)
RNV	15,5% 7/45	13,8% 8/58	1,000	1,150	(0,324-3,992)
Gestación gemelar	9,1% 1/11	7,7% 1/13	1,000	1,191	(0,014-101,85)
Media de preembriones transferidos	1,60	1,70			

realización del AH con diversos resultados en tasas de gestación e implantación. Cohen et al., en 1992, demostraron que cuando la edad media de las pacientes tratadas era de $36,7 \pm 3,7$ años (edad materna avanzada), tanto la tasa de gestación como de implantación eran significativamente superiores en el grupo de pacientes en las que los preembriones transferidos fueron sometidos a AH con ácido tyrode, 64,0% vs 48,0%, 25,0% vs 18,0%. Schoolcraft et al., 1994 reportan un aumento en las tasas de implantación de 33,0% en el grupo AH frente al 6,5% en el grupo no AH. Estos mismos investigadores publican en 1995 estudios realizados a mujeres de 40 años o más, un aumento en las tasas de gestación (58,0% en el grupo AH tyrode vs 21,0% del grupo no AH). Stein et al., 1995 estudiaron 86 pacientes mayores de 38 años, de las cuales los preembriones de 46 pacientes fueron tratados con PZD y 43 correspondían al grupo control, demostrando un aumento significativo en las tasas de gestación (23,9% en el grupo AH, frente 7,0% en el grupo no AH). Las tasas de gestación reportadas en 1998 por Magli et al., en pacientes con edades de 38 años o más son del 14,3% en el grupo AH con tyrode y 10,0% sin aplicar la técnica, siendo comparables los resultados. Por otro lado, Edirisinghe et al., 1999 publican que cuando se utiliza la técnica PZD no se incrementan las tasas de gestación/implantación en el grupo de mujeres que tienen 38 años o más. Sin embargo, estudios descritos por Horng et al., 2002 no observan ningún efecto positivo cuando la técnica LAH total es aplicada a 40 pacientes, puesto que las tasas de gestación son similares que cuando no se aplica la técnica a 80 pacientes mayores de 37 años (17,5% vs 16,3%). Dos estudios prospectivos aleatorizados tampoco encontraron incremento en las tasas de gestación e implantación en pacientes que pertenecían a grupos de edades de 37 años o más (Primi et al., 2004; Frydman et al., 2006).

La publicación de Hsieh et al., 2002 refleja la eficiencia de la técnica en mujeres de edad avanzada, pero haciendo una comparación de LAH total vs tyrode, consiguiendo tasas de gestación/implantación más altas en LAH que en el grupo de metodología química: 31,8%/8,2% vs 16,1%, 3,8%.

En la bibliografía consultada se han encontrado 5 estudios donde se realiza LAHA a mujeres entre 34 y 40 años.

Antinori reporta las ventajas del láser por afinamiento a preembriones cuyo grosor de la zona pelúcida era mayor de 12 μ m, aumentado de forma significativa las tasas de implantación en preembriones de D2 de desarrollo en

200 pacientes de 34 años o más con indicación de fallo de implantación (12,2, LAHA vs 7,3% no LAHA) y 232 pacientes en un primer intento de técnicas de reproducción asistida (11,8 LAHA vs 7,1% no LAHA) (Antinori et al., 1996a,b).

Baruffi et al., 2000 valoran el papel de la técnica en pacientes menores de 37 años en un estudio aleatorizado, obteniendo 33,3% de tasa de gestación en el grupo de LAHA comparado con el grupo control —40,3%—, concluyendo que esta técnica no beneficiaba a este grupo de pacientes. De igual forma, en un análisis retrospectivo realizado por Petersen et al., 2002 se observa que en pacientes de edad avanzada no se incrementan los resultados de gestación, implantación con este tipo de técnica en 100 pacientes. La tasa de embarazo/implantación (16,0% vs 7,0%) de 50 pacientes que pertenecían al grupo LAH no era significativa frente a 50 pacientes que pertenecían al grupo no LAHA (22,0% vs 8,2%).

El objetivo de Ghobara et al., 2006 fue investigar si existía un cambio en los resultados de gestación e implantación en la forma de realizar la técnica de LAH, total o por afinamiento, concluyendo que LAHA está asociado con tasas altas de gestación e implantación en pacientes menores y mayores de 38 años. Ng et al. (2008) y Kutlu et al. (2010) no encontraron en sus estudios un impacto positivo en las tasas de gestación e implantación en pacientes menores y mayores de 35 años con LAHA.

Se considera edad avanzada cuando la paciente tiene 38 años o más, pero según las publicaciones hay mucha incongruencia en resultados, tanto en edad como en metodología.

Recientemente se ha demostrado en una publicación del Sistema Nacional de Vigilancia en TRA (NASS) de Estados Unidos, en el período 2000-2010, el incremento del uso del AH de forma significativa en embriones de D3 (de 50,7% a 56,3%) y en D5 (de 15,9% al 22,8%). En pacientes con edad materna avanzada el incremento ha sido de un 3,0% (Kissin et al., 2014). Los datos globales de recién nacido vivo con transferencias en D3 con AH son 28,3% frente al grupo de no AH 36,5%, y en transfer en D5, 36,9% con AH y sin AH 47,5%. En el grupo de 38 años o 2 ciclos previos de TRA son de 20,7% vs 24,1% en D3 y 28,6% vs 34,9% en D5.

También observan un incremento en tasas de aborto en el grupo de AH frente al no AH 18,9% vs 13,5% en D3 y en D5: 16,2% vs 12,3%.

Aunque este estudio observacional es limitado por datos incompletos, no se encuentra una relación del *assisted hatching* con una mejora de las tasas de embarazos y RNV en ciclos de ovocitos propios en TRA. Los autores proponen realizar estudios prospectivos para identificar a las pacientes que se puedan beneficiar de esta técnica.

En nuestro estudio la tasa de RNV (42,7% vs 26,7%, $p=0,018$, IC 95% [0,259-0,910]) es más alta en el grupo de LAHA 38 y 39, 40 años que en el grupo no LAHA 38 y 39 años con $p<0,05$, demostrando la eficiencia y seguridad de la técnica LAHA.

Los nacimientos gemelares monocigóticos se confirman cuando se observa ecográficamente en un saco amniótico 2 fetos (monoamniótico-monocoriónico), o 2 sacos separados (diamniótico-monocoriónico) (Alíkani et al., 1994).

La incidencia de gemelos monocigóticos sin estimulaciones ováricas está alrededor de 0,4-0,45% (Derom et al., 1987), mientras que los datos de gemelos monocigóticos tras TRA son del 2,3% (Blickstein et al., 2003).

En el contexto de TRA existe un gran debate alrededor del incremento de la tasa de gemelaridad monocigótica. Se han sugerido factores como condiciones de cultivo, malformación o endurecimiento de la zona pelúcida preembrionaria, cavitación múltiple del blastocisto, manipulaciones *in vitro* del gameto femenino y el orificio creado de forma artificial en la zona pelúcida (Cohen et al., 1990), edad materna avanzada, estimulación ovárica, manipulación de la zona pelúcida, efectos de la temperatura y el cultivo *in vitro* (Aston et al., 2008).

La revisión realizada por Aston señala estudios que indican el incremento del riesgo de gemelos monocigóticos: desde 1,2% hasta 5,9%. De la misma manera encuentra varios estudios donde demuestra que no existe una asociación entre la manipulación de la zona pelúcida y el incremento de gemelos monocigóticos.

Las condiciones de cultivo subóptimas que conducen a una división de la masa celular interna por una apoptosis selectiva, o por un colapso del blastocelo en preembriones *in vitro*, ha sido propuesto como mecanismo que contribuye al incremento de gemelos monocigóticos en transferencias de preembriones en estado de blastocisto (Aston et al., 2008).

Los resultados en nuestro estudio de los RNV gemelares en el grupo LAHA 38 y 39 años es de 17,7% vs 5,7% no LAHA 38 y 39 años. Es más del doble en el grupo LAHA 38 y 39, pero hacemos hincapié en que ninguna gestación fue gemelar monocigótica, y tomando como referencia la transferencia de máximo de 2 preembriones por paciente.

Con estos datos de gestaciones gemelares y no monocigóticas no estamos implementando el efecto negativo de LAHA como refieren las publicaciones de Cohen et al., 1990 y Hershlag et al., 1999.

Los primeros estudios en la utilización del láser en gametos y preembriones, con estudios previos en ratones, demuestran el aumento en las tasas de implantación (Tadiri et al., 1991; Khalifa et al., 1992; Germond et al., 1995).

El uso del láser es una técnica no traumática para los preembriones humanos, referenciado en el estudio de Antinori et al., 1996a,b, donde forma 3 grupos de pacientes mayores de 36 años, diferenciados en un primer grupo con preembriones tratados y no tratados con LAHA, un segundo grupo con solo preembriones tratados y un tercer grupo con

preembriones no tratados, siendo este el grupo control. En este estudio evidenció la efectividad de la técnica con los siguientes resultados de gestación: 36,4%, 44,4% y 19,3% respectivamente.

El LAH es una técnica que evita la toxicidad que se puede producir con el uso del ácido tyrode. Es una técnica segura, no produce anomalías genéticas y más aún si se realiza no de una manera total, sino parcial, se evita la posibilidad de pérdida de blastómeros durante la transferencia (Antinori et al., 1996a,b).

El impacto positivo que ha tenido la aplicación del láser es apoyado por varios autores (Germond et al., 1995; Balaban et al., 2002) y también al existir en los últimos años diversas modalidades del *assisted hatching*, como *hatching* total, parcial o afinamiento de la zona pelúcida (Ebner et al., 2005).

La utilización del láser de diodo de 1,48 μm es una buena herramienta para ser empleada en ciclos de FIV/ICSI por su rapidez, simplicidad, seguridad y apoyado por nacimientos de niños sanos después de su aplicación (Ebner et al., 2005).

The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology (2014) publica que no hay suficientes datos que evidencien el efecto positivo del AH en RNV. Refiere que hay un leve aumento en pacientes de peor pronóstico reproductivo con transferencias preembrionarias más AH. Observan que el AH está asociado con el riesgo de gemelos monocigóticos, pero no existe una evidencia suficiente.

Concluye que el AH no se recomienda como una técnica de rutina para todas las pacientes que se sometan a TRA, sino en casos de peor pronóstico reproductivo.

Conclusiones

En conclusión, este estudio sugiere que el LAHA en pacientes entre 38 y 39 años mejora las tasas de gestación, implantación y RNV sano gracias al desarrollo de este láser, que desde hace décadas se usa de forma rutinaria en todos los casos de biopsia pre-embionaria para diagnóstico genético preimplantacional (DGP), mejorando considerablemente los resultados y aumentando la seguridad de la técnica.

Las pacientes de 40 años o más no se benefician de esta técnica probablemente debido a la mayor presencia de anomalías cromosómicas.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a todo el equipo IVI Murcia su colaboración en este trabajo.

Bibliografía

- Alikani, M., Noyes, N., Cohen, J., Rosenwaks, Z., 1994. *Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture*. *Human Reproduction* 9, 1318–1321.
- Antinori, S., Selman, H.A., Caffa, B., Panci, C., Dani, G.L., Versaci, C., 1996a. *Zona thinning with the use of laser: A new approach to assisted hatching in humans*. *Human Reproduction* 11, 590–596.
- Antinori, S., Panci, C., Selman, H.A., Caffa, B., Dani, G., Versaci, C., 1996b. *Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy*. *Human Reproduction* 11, 2488–2492.
- Aston, K.I., Peterson, C.M., Carrel, D.T., 2008. *Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: A review*. *Reproduction* 136, 377–386.
- ASEBIR Asociación Española de Biología de la Reproducción., 2007. *II Criterios de Valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocitos humanos*. Cuadernos de Embriología Clínica.
- Balaban, B., Bulent, U., Alatas, C., Mercan, R., Mumcu, A., Isiklar, A., 2002. *A comparison of four different techniques of assisted hatching*. *Human Reproduction* 17, 1239–1243.
- Baruffi, R., Mauri, A., Petersen, C., Ferreira, R., Coelho, J., Franco Jr., J., 2000. *Zona thinning with noncontact diode laser in patients aged 37 years with no previous failure of implantation: A prospective randomized study*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 17, 557–560.
- Blickstein, I., Jones, C., Keith, L.G., 2003. *Zygotic splitting rates after single-embryo transfer in in vitro fertilization*. *New England Journal of Medicine* 348, 2366–2367.
- Cohen, J., Malter, H., Wright, G., Kort, H., Massey, J., Mitchell, D., 1989a. *Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated*. *Human Reproduction* 4, 435–442.
- Cohen, J., Carlene, E., Hilton, K., Malter, H., Massey, J., Meyer, M., et al., 1990. *Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation*. *Human Reproduction* 5, 7–13.
- Cohen, J., Alikani, M., Trowbridge, J., Rosenwaks, S., 1992. *Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis*. *Human Reproduction* 7, 685–691.
- Cohen, J., Imge, K.L., Suzman, M., Wiker, S.R., Wright, G., 1989b. *Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation*. *Fertility and Sterility* 51, 820–827.
- Das, S., Blake, D., Farquhar, C., Seif, M.M., 2009. *Assisted hatching on assisted conception (IVF and ICSI)*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD001894.pub4>, Art. No.: CD001894.
- Derom, C., Vlietinck, R., Derom, R., Van den Berghe, H., Thiery, M., 1987. *Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction*. *Lancet* 30, 1236–1238.
- Ebner, T., Moser, M., Tews, G., 2005. *Possible applications of a non-contact 1.48 µm wavelength diode laser in assisted reproduction technologies*. *Hum Reproduction* 11, 425–435.
- Edi-Osaghie, E., Hooper, L., Seif, W., 2003. *The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception: A systemic review*. *Human Reproduction* 18, 1828–1835.
- Edirisinghe, W., Ahnonkitpanit, V., Promviengchai, S., Suwajakorn, S., Pruksananonda, K., Chinpilas, V., et al., 1999. *A Study failing to determine significant benefits from assisted hatching: Patients selected for advanced age, zonal thickness of embryos, and previous failed attempts*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 16, 294–301.
- Escudero, E., Bosh, E., Crespo, J., Simón, C., Remohí, J., Peller, A., 2004. *Comparison of two different starting multiple dose gonadotropin-releasing hormone antagonist protocols in a selected group of in vitro fertilization embryo transfer patients*. *Fertility and Sterility* 81, 562–566.
- Fong, C., Bongso, A., Ng, S., Kuman, J., Trounson, A., Ratman, S., 1998. *Blastocyst transfer after enzymatic treatment of the zona pellucida: Improving in-vitro fertilization and understanding implantation*. *Human Reproduction* 13, 2926–2932.
- Frydman, N., Madoux, S., Hesters, L., Duvernoy, C., Feyereisen, E., Ledu, A., et al., 2006. *A randomized double-blind controlled study on the efficacy of laser zona pellucida thinning on live birth rates in cases of advanced age*. *Human Reproduction* 21, 2130–2135.
- Ge, H.S., Zhou, W., Zhang, W., Lin, J., 2008. *Impact of assisted hatching on fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles: A prospective, randomized study*. *Reproductive BioMedicine Online* 16, 589–596.
- Gabrielsen, A., Agerholm, B., Toft, F., Hald, F., Petersen, K., Agaard, J., et al., 2006. *Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study*. *Human Reproduction* 19, 2258–2262.
- García-Velasco, J., Bermejo, A., Ruiz, F., Martínez-Salazar, J., Requena, A., Pellicer, A., 2011. *Cycle scheduling with oral contraceptive pills in the GnRH antagonist protocol vs the long protocol: A randomized, controlled trial*. *Fertility and Sterility* 96, 590–593.
- Germond, M., Rink, K., Nocera, D., Delacretaz, G., Senn, A., Fakan, S., 1995. *Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48 µm diode laser beam: Efficacy and safety of the procedure*. *Fertility and Sterility* 64, 604–611.
- Ghobara, T.S., Cahill, D.J., Ford, W.C.L., Collyier, H.M., Wilson, P.E., Al-Nuaim, L., et al., 2006. *Effects of assisted hatching method and age on implantation rates of IVF and ICSI*. *Reproductive BioMedicine Online* 13, 261–267.
- Hershlag, A., Paine, T., Cooper, G., Scholl, G., Rawlinson, K., Kvapil, G., 1999. *Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching*. *Fertility and Sterility* 71, 144–146.
- Hong, S., Chang, C., Wu, H., Wuang, C., Cheng, C., Huang, H., et al., 2002. *Laser-assisted hatching of embryos in women of advanced age after in vitro fertilization: A preliminary report*. *Chang Gung Medical Journal* 25, 531–536.
- Hsieh, Y., Huan, C., Cheng, T., Chang, C., Tsai, H., 2002. *Laser-assisted hatching of embryos is better than the chemical method for enhancing the pregnancy rate in women with advanced age*. *Fertility and Sterility* 78, 179–182.
- Khalifa, E.A., Tucker, M.J., Hunt, P., 1992. *Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse*. *Human Reproduction* 7, 532–536.
- Kissin, D., Kawwass, J., Monsour, M., Boulet, S., Session, D., Jamieson, D., 2014. *Assisted hatching: trends and pregnancy outcomes*. *United States, 2000-2010*. *Fertility and Sterility* 102, 795–801.
- Kutlu, P., Atvar, O., Vanglioglu, O., 2010. *Laser assisted zona thinning technique has no beneficial effect on the ART outcomes of two different maternal age groups*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 27, 457–461.
- Magli, C., Gianaroli, L., Ferraretti, A., Fortini, D., Aicardi, G., Montanaro, N., 1998. *Rescue of implantation potential in embryos*

- with poor prognosis by assisted zona hatching. *Human Reproduction* 13, 1331–1335.
- Mantoudis, E., Podsiadly, B., Gorgy, A., Venkat, G., Craft, I.L., 2001. A comparison between quarter, partial and total laser assisted hatching in selected infertility patients. *Human Reproduction* 10, 2182–2186.
- Martins, W., Rocha, I., Ferriani, R., Nastri, C., 2011. Assisted hatching of human embryos: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Human Reproduction Update* 17, 438–453.
- Montag, M., Van der ven, H., 1999. Laser-assisted hatching in assisted reproduction. *Croatian Medical Journal* 40, 398–403.
- Ng, E.H.Y., Lau, E.Y.L., Yeung, W.S.B., Cheung, T.M., Tang, O.S., Ho, P.C., 2008. Randomized double-blind comparison of laser zona pellucid thinning and breaching in frozen-thawed embryo transfer at the cleavage stage. *Fertil Steril* 89, 1147–1153.
- Petersen, C., Mauri, A., Baruffi, R., Pontes, A., Franco, J., 2002. Zona thinning with a noncontact diode laser in ICSI embryos from women of advanced age. *J Assist Reprod Genet* 19, 512–516.
- Practice Committee of the American Society for Assisted Reproductive. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2014. The role of assisted hatching in in vitro fertilization: A review of the literature. A committee opinion. *Fertility and Sterility* 102, 348–351.
- Primi, M., Senn, A., Montag, M., Van den Ver, H., Mandelbaum, J., Veiga, A., et al., 2004. European multicenter prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations. *Human Reproduction* 19, 2325–2333.
- Schiewe, M., Neev, J., Hazeleguer, N., Balmaceda, J., Berns, W., Berns, T.Y., 1995. Development competence of mouse embryos following zona drilling using a non-contact holmium: Yttrium scandium gallium garnet (Ho:YSGG) laser system. *Human Reproduction* 10, 1821–1824.
- Schoolcraft, W., Jones, G., Schlenker, T., Jonas, H., Gee, M., 1994. Assisted hatching in the treatment of poor prognosis in vitro fertilization candidates. *Fertility and Sterility* 62, 551–553.
- Schoolcraft, W., Schlenker, T., Jones, G., Jones, H., 1995. In vitro fertilization in woman age 40 and older: The impact of assisted hatching. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 12, 581–584.
- Stein, A., Pinkas, H., Rufas, O., Ovadia, J., Amit, S., Fisch, B., 1995. Assisted hatching by partial zona dissection of human pre-embryos in patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 63, 838–841.
- Strohmer, H., Feichtinger, W., 1992. Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program. *Fertility and Sterility* 58, 212–214.
- Tadir, Y., Wright, W., Vafa, O., Liaw, L.H., Ash, R., Berns, M.W., 1991. Micromanipulation of gametes using laser microbeam. *Human Reproduction* 6, 1011–1016.