

REVISIONES

Evaluación de la técnica de eclosión asistida

Juan Manuel Moreno^a, José Jesús López-Gálvez^a, Manuel Lloret^a, Juan José Lobato^a, Ana Segura^a y Joaquín Rueda^{b,c}

^aUnidad de Reproducción. Hospital Clínica Vistahermosa. Alicante. España.

^bUnidad de Genética. Hospital Clínica Vistahermosa. Alicante. España.

^cÁrea de Biología Celular. Universidad Miguel Hernández. Alicante. España.

RESUMEN

Actualmente se dispone de una técnica para mejorar la eficacia de los tratamientos de fecundación in vitro. Esta técnica, denominada eclosión asistida, se va incorporando a los laboratorios de reproducción asistida con el ánimo de mejorar las tasas de implantación. Sin embargo, los diferentes métodos utilizados, los distintos criterios de selección de pacientes y embriones, el reducido número de casos incluidos en los estudios, y el escaso número de embríólogos entrenados en estos procedimientos, dificultan la valoración de los resultados entre los distintos grupos, lo que es necesario para establecer el beneficio verdadero de esta técnica. Por ello, con este trabajo, se pretende describir y valorar su utilidad a la luz de los conocimientos existentes aportando, al mismo tiempo, nuestra experiencia personal.

Palabras clave: Eclosión asistida. Eliminación de fragmentos. Eliminación de células lisadas. Ácido de Tyrode.

ABSTRACT

Assessment of an assisted hatching technique

At the moment, we have a procedure to improve the effectiveness of in vitro fertilisation treatment. This procedure, called assisted hatching, is being included in assisted fertilisation laboratories to improve implantation rates. However, the different methods used, the different patient and embryo selection criteria, the low number of cases included in studies and the low number of embryologists trained in these procedures makes it difficult to assess the results between the different groups, which is essential to establish the real benefits of this technique. For this reason, in this article we attempt to describe and assess the usefulness in the light of the existing knowledge along with our personal experience.

Key words: Assisted hatching. Fragments disposal. Lysed blastomeres disposal. Tyrode's acid.

INTRODUCCIÓN

La eclosión asistida (EA) es una técnica que se utiliza en los laboratorios de reproducción asistida con el ánimo de mejorar los resultados en los procesos de fecundación in vitro. La EA consiste en crear, de manera artificial, un orificio en la zona pelúcida del embrión, para facilitar el proceso natural de eclosión. Cohen et al^{1,2} fueron los primeros en desarrollar esta técnica al observar que los embriones a los que habían realizado la disección parcial de la zona pelúcida, antes de ser transferidos al útero materno, tenían unas tasas de implantación más altas que aquellos a los que

no se les había realizado. Desde entonces se han ido definiendo una serie de indicaciones que a continuación se enumeran y detallan.

INDICACIONES

Edad

La tasa de implantación desciende progresivamente a partir de los 37 años haciéndose más evidente más allá de los 40 años. El proceso de envejecimiento ovárico favorece el aumento de alteraciones cromosómicas en el ovocito^{3,4} que pueden llegar a afectar la habilidad del embrión para eclosionar in vivo e implantar⁵. Diversos autores recomiendan la EA como técnica para mejorar la tasa de implantación en pacientes ≥ 35 años⁶. Sin embargo, otros investigadores no encontra-

Correspondencia: Dr. J.M. Moreno García.
Unidad de Reproducción. Clínica Vistahermosa.
Avda. de Denia, 103. 03015 Alicante. España.
Correo electrónico: lab@urvistahermosa.com

ron una tasa de implantación mayor cuando se aplicó la técnica en mujeres ≥ 37 años con menos de 3 fallos de implantación⁷.

Aumento de la hormona folículo estimulante basal sérica

A pesar de las mejoras constantes en los protocolos de estimulación, sigue habiendo bajas tasas de implantación en pacientes que tienen elevada la hormona folículo estimulante (FSH) en el día 3 del ciclo. Esta situación puede afectar tanto al ambiente endocrino, paracrino y autocrino del folículo como a la zona pelúcida del ovocito, comprometiendo posteriormente su desarrollo⁸. Las pacientes que presentan valores séricos basales elevados de FSH parecen tener una mayor tasa de gestación tras la EA⁹.

Fallos de implantación

Cuando una paciente ha tenido 2 fracasos de implantación, cualquiera que sea su edad, algunos autores consideran la EA como técnica de ayuda para intentos posteriores, pues favorece la implantación más temprana del embrión en desarrollo al permitir una sincronía más adecuada entre el embrión y el endometrio¹⁰.

Zona pelúcida engrosada (fig. 1)

El grosor de la zona pelúcida varía durante el desarrollo embrionario, y a partir de las primeras divisiones celulares se adelgaza hasta hacerse una fina capa durante el estadio de blastocisto. El fallo en el proceso de adelgazamiento puede impedir la implantación del embrión¹¹. Se ha propuesto el uso sistemático de la

EA cuando el grosor de la zona pelúcida es $> 15 \mu\text{m}$ para facilitar el proceso natural de eclosión al disminuir las necesidades metabólicas del embrión para realizar dicho proceso¹². Otros autores sugieren que la técnica mejora de manera importante las tasas de implantación en mujeres más jóvenes con zonas pelúcidas engrosadas, pero no así en mujeres jóvenes¹³. También se ha observado un efecto perjudicial en la tasa de embarazo cuando se aplica la técnica en embriones con zonas pelúcidas $< 13 \mu\text{m}$ ¹².

Fragmentación excesiva (fig. 2)

Los fragmentos celulares son porciones de citoplasma carentes de núcleo¹⁴ y rodeados de membrana. La mayoría de los fragmentos se forman durante la mitosis, durante las 2 primeras divisiones celulares, y su presencia parece ser común en los embriones humanos¹⁵, aunque se desconoce la señal extrínseca o intrínseca que los genera. Aun así, se piensa que cuanto mayor es el grado de fragmentación menor es la capacidad del embrión para realizar una adecuada división celular¹⁶. Por tanto, los embriones que muestran menos cantidad de fragmentos se consideran más competentes desde el punto de vista del desarrollo y se les da prioridad para la transferencia^{17,18}.

El potencial de implantación de los embriones fragmentados no sólo se determina por el grado de fragmentación sino también por su tamaño y distribución dentro del embrión. Se sugiere la EA, con eliminación de los fragmentos, como medio para restablecer la capacidad de desarrollo en embriones con más del 25% de fragmentos, independientemente de su tamaño y distribución. Con su uso, se restablece la relación espacial de los blastómeros, el contacto entre las células y los planos normales de división del embrión,



Figura 1. Embrión en día 3 de desarrollo en el cual se observa la zona pelúcida con un grosor $> 15 \mu\text{m}$.



Figura 2. Presencia de fragmentos de diferente tamaño distribuidos en todo el embrión.

dando lugar a la formación de blastocitos de mejor pronóstico¹⁹ a la luz de los conocimientos actuales acerca de diferentes tipos de uniones celulares en las células centrales y en la periferia. Sin embargo, otros piensan que cualquier embrión fragmentado no logrará restablecer su capacidad de desarrollo aunque se aspiren dichos fragmentos, ya que ciertos patrones de fragmentación pueden estar relacionados con la pérdida parcial o total de proteínas reguladoras necesarias para el desarrollo del embrión²⁰.

Criotransferencia

Las tasas de embarazo e implantación en transferencias de embriones criocongelados son habitualmente bajas comparadas con las de embriones en fresco. El endurecimiento de la zona pelúcida²¹ junto con la presencia de blastómeras lisadas tras el proceso de congelación y descongelación llega a comprometer la viabilidad embrionaria (fig. 3). Mediante la EA se consigue restablecer la capacidad de desarrollo e implantación en estos embriones una vez descongelados²²⁻²⁵.

En un estudio prospectivo realizado por nuestro equipo²⁶ se evaluó la eficacia de esta técnica en embriones en día 3 de desarrollo descongelados, eliminando el material degenerado y transfiriendo únicamente 2 embriones para evitar el embarazo múltiple. En todos los embriones transferidos se consiguió eliminar la mayor parte de los fragmentos dejando como máximo un 10% en su interior. Los resultados dieron unas tasas de embarazo e implantación por transferencia del 42,8 y del 21,4%, respectivamente, siendo éstas muy superiores a los resultados obtenidos en el último Registro Nacional de Centros efectuado por la Sociedad Española de Fertilidad, que reflejan una tasa de embarazo global por transferencia del 25,3%²⁷.



Figura 3. Lisis celular en un embrión descongelado. La célula dañada presenta un aspecto picnótico.

Sin embargo, hay autores que no encuentran ningún beneficio con el uso sistemático de la técnica al no encontrar diferencias significativas en las tasas de embarazo, embarazo múltiple e implantación al comparar los resultados con un grupo control²⁸. Estos resultados podrían deberse a que no eliminan el material lisado de los embriones descongelados, pudiendo afectar posteriormente a la degeneración secundaria de células sanas adyacentes.

ASPECTOS TÉCNICOS

En la bibliografía hay descritos varios métodos para la realización de la EA (mecánicos, químicos, con láser) e incluso para el adelgazamiento de la zona pelúcida²⁹. Los laboratorios que utilizan estas técnicas, usan uno u otro método dependiendo de la experiencia del embriólogo que lo realiza y la disponibilidad técnica. En cualquier caso, el proceso requiere mucho cuidado en su ejecución para que no se produzca la lisis de alguna de las células del embrión y reste posibilidades de éxito. Además, se ha valorado si la EA provocaba algún efecto perjudicial en los embriones y se ha demostrado que la técnica no sólo aumenta la tasa de implantación sino que además no afecta en la tasa de anomalías cromosómicas en los nacidos vivos⁶.

En un estudio prospectivo y aleatorizado³⁰ que comparaba los métodos mecánicos y el láser dio como resultado una tasa de implantación significativamente más alta en el grupo del láser, además de una tasa de embarazo a término mayor, aunque no significativa. Puede que el método mecánico, aunque fácil de ejecutar, no de muy buenos resultados debido a que el pequeño orificio que se crea por la aguja de disección produzca la posterior estrangulación del blastocisto cuando intenta eclosionar¹. Otro método mecánico, con resultados prometedores es el piezomicromanipulador, que consiste en un sistema de vibración de alta frecuencia que adelaza o rompe la zona pelúcida. Sin embargo, su inconveniente principal es que al igual que el láser es un método costoso³¹.

En otro estudio también prospectivo y aleatorizado³² donde se evaluó el método químico con ácido de Tyrode y el láser en el desarrollo del blastocisto, ambos métodos dieron un resultado similar al no encontrar diferencias significativas en la proporción de blastocitos obtenidos. El método químico, aunque requiere entrenamiento previo, tiene la ventaja de estar al alcance de cualquier laboratorio³³, pero hay que tener cuidado con el ácido pues se corre el riesgo de que un volumen excesivo dañe alguna célula de los embriones. Por otro lado, el láser endurece el área de

la zona pelúcida expuesta³⁴ pudiendo dificultar la posterior aspiración de los fragmentos. Sin embargo, las ventajas de utilizar el láser frente al ácido de Tyrode son la velocidad y la precisión en su ejecución, no es tóxico y puede que se constituya como método de elección al reducir la experiencia técnica necesaria para llevarla a cabo. En otras palabras, puede estandarizar una técnica que actualmente no está normalizada.

En la bibliografía tampoco hay datos que nos sugiera el día adecuado para realizar la EA. De hecho, la mayoría de los centros la realiza instantes antes de efectuar la transferencia, es decir, en día 3 de desarrollo embrionario. A nuestro juicio, al realizar la técnica en el día 2 de cultivo, se corre el riesgo de que pueda salir alguna célula, al no estar todavía establecida en este estadio la adhesión celular. Y por otro lado, si se efectúa en el día 5 o 6 de cultivo, se puede dañar alguna célula cercana a la zona pelúcida del blastocisto, comprometiendo su desarrollo.

Varios estudios relacionan el tamaño del orificio en la zona pelúcida con el incremento de la frecuencia de gemelos monocigóticos^{35,36}, por lo que se aconseja no realizar aberturas muy pequeñas que puedan causar la herniación del blastocisto. Tampoco son recomendables las aberturas muy grandes ya que se corre el riesgo de la salida de algún blastómero que comprometa la capacidad de desarrollo del embrión.

Aún no está claro si la eliminación de fragmentos y células lisadas permite restablecer la capacidad de desarrollo de los embriones de peor pronóstico. Posiblemente, la experiencia del embriólogo que la lleva a cabo es esencial ya que no ejecutarla con extremo cuidado puede dañar alguna de las células sanas del embrión.

VALORACIÓN ACTUAL

En un estudio multicéntrico, prospectivo y aleatorizado³⁷, donde se valoró la eficacia de la técnica, no se encontró ningún beneficio en ninguna de las indicaciones anteriormente descritas, pero se llegó a la conclusión de que sería necesario fortalecer los criterios de selección de los pacientes para evaluar la eficacia de la técnica.

Por otro lado, en un metaanálisis³⁸ donde se examinó si la EA mejoraba las tasas de embarazo y niño nacido sano, y si favorecía el embarazo múltiple y el aborto, se llegó a la conclusión de que aunque la técnica mejoraba significativamente las probabilidades de embarazo clínico y la tasa de niño nacido sano, no hay suficientes evidencias para recomendar la EA como técnica de rutina. También se observó que la

técnica no incrementa la tasa de embarazo múltiple.

Actualmente, debido a los diferentes métodos utilizados, los distintos criterios de selección de pacientes y embriones, el reducido número de casos incluidos en los estudios, y el escaso número de embriólogos entrenados en este procedimiento, resulta muy difícil valorar los resultados entre los distintos grupos. Sería necesario estandarizar la metodología y los criterios de inclusión para establecer el beneficio verdadero de esta técnica.

Bibliografía

- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum Reprod.* 1990;5:7-13.
- Cohen J, Inge KL, Suzmann M, Wiker SR, Wright G. Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: A retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril.* 1989;51:820.
- Plachot M, Veiga A, Montagut J, De Grouchy J, Calderón G, Lepretre S, et al. Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life?: a multicentric study. *Hum Reprod.* 1988;3:627-35.
- Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod.* 1996;11:2217.
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosomal abnormalities. *Fertil Steril.* 1995;64: 382.
- Ma S, Rowe T, Yuen BH. Impact of assisted hatching on the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a prospective, randomized clinical trial and pregnancy follow-up. *Fertil Steril.* 2006;85:895-900.
- Frydman N, Madoux S, Hesters L, Duvernoy C, Feyereisen E, Le Du A, et al. A randomized double-blind controlled study on the efficacy of laser zona pellucida thinning on live birth rates in cases of advanced female age. *Hum Reprod.* 2006; 21:2131-5.
- Loret de Mola JR, Garside WT, Bucci J, Tureck RW, Heyner S. Analysis of the human zona pellucida during culture: correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J Assist Reprod Genetics.* 1997;14:332.
- Fasouliotis SJ, Simon A, Laufer N. Evaluation and treatment of low responders in assisted reproductive technology: a challenge to meet. *J Assist Reprod Genet.* 2000;17:357-73.
- Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Oliveira JB, Massaro FC, Elder K, et al. Implantation failures: success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning. *Reprod Biomed Online.* 2005;10:224-9.
- Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod.* 2001; 16:2166-70.
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod.* 1992;7:685.
- Eun DS, Park JY, Kong ES, et al. Comparison of pregnancy rate according to the zona pellucida thickness between biochemical assisted hatching group and nonassisted hatching group. *Fertil Steril.* 2000;74 Suppl 1:151.
- Dale B, Tosti E, Iaccarino M. Is the plasma membrane of the human oocyte reorganized following fertilization and early cleavage? *Zygote.* 1995;3:31.
- Zaminovic N. Assisted Hatching and fragment removal. En: Veeck LI, editor. An atlas of human gametes and conceptuses. London: Parthenon Press; 1998.
- Xu K, Rosenwaks Z. The importance of cytoplasm in early embryonic development. *J Assist Reprod Genetics.* 1996; 13:1.

17. Alikani, M, Calderón, G, Tomkin, G, Garrisi, J, Kokot, M, Cohen, J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod.* 2000; 15:2634-43.
18. Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod BioMed Online.* 2003;6:232-31.
19. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril.* 1999;71:836-42.
20. Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod.* 1999;14:429-47.
21. Alikani M, Cohen J. Advances in clinical micromanipulation of gametes and embryos. *Arch Pathol Lab Med.* 1992;116:373-8.
22. De Moraes LA, De Miranda Cota AM. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Hum Reprod.* 2005;20:1429.
23. Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, Hald F, Peterson K, Aagaard J, et al. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Hum Reprod.* 2004;19:2258-62.
24. Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Oliveira JB, Felipe V, Massaro FC, et al. Laser-assisted hatching of cryopreserved-thawed embryos by thinning one quarter of the zona. *Reprod Biomed Online.* 2006;13:668-75.
25. Balaban B, Urman B, Yakin K, Isiklar A. Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were allowed to cleave in vitro after thawing: a prospective randomized study. *Hum Reprod.* 2006; 21:2136-40.
26. Moreno JM, Gil L, López Gálvez JJ, Lloret M, Sánchez R, Rueda J. Eclosión asistida con aspiración fragmentación en criotransferencias de dos embriones. III Congreso de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción. Zaragoza, 2005;2(10).
27. Marqueta J, Hernández H, Castillas JA, Cabello Y. Registro SEF 2003. Sociedad Española de Fertilidad; 2006.
28. Ng EH, Naveed F, Lau EY, Yeung WSB, Chi Wai Chan C, Shan Tang O, et al. A randomized double-blind controlled study of the efficacy of laser-assisted hatching on implantation and pregnancy rates of frozen-thawed embryo transfer at the cleavage stage. *Hum Reprod.* 2005;20:979-85.
29. Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Kulski P, Martín-Pont P, Bottero J, et al. A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers. *Hum Reprod.* 2006;21:2384-9.
30. Makrakis E, Angelis I, Agapitou K, Pappas K, Dafereras A, Pantos K. Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril.* 2006;86:1596-600.
31. Nakayama T, Fujiwara H, Yamada S, Tastumi K, Honda T, Fujii S. Clinical application of a new assisted hatching method using a piezo-micromanipulator for morphologically low-quality embryos in poor-prognosis infertile patients. *Fertil Steril.* 1999;71:1014-8.
32. Jones AE, Wright G, Kort HI, Straub RJ, Nagy ZP. Comparison of laser-assisted hatching and acidified Tyrode's hatching by evaluation of blastocyst development rates in sibling embryos: a prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2006;85:487-91.
33. Moreno JM, López JJ. Enciclopedia audiovisual de técnicas de reproducción asistida: Eclosión asistida. Animatic. 2006;1.
34. Malter H, Schimmel T, Calderón G, Cohen J. Use of Lasers in assisted Reproduction. Annual Review of Preimplantation Embryology. Cancum, México. 2001;147-56.
35. Hershalg A, Paine T, Cooper GW, Scholl GM, Rawlinson K, Kvapil G. Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil Steril.* 1999;71:144-6.
36. Schieve LA, Meikle SF, Peterson HB, Jeng G, Burnett NM, Wilcox LS. Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through in vitro fertilization? *Fertil Steril.* 2000;74:288-94.
37. Primi MP, Senn A, Montag M, Van der Ven H, Mandelbaum J, Veiga A, et al. A European multicentre 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. *Hum Reprod.* 2004; 19:2325-33.
38. The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The role of assisted hatching in in vitro fertilization: a review of the literature. A Committee opinion. *Fert Steril.* 2006;85:544-6.