

# Falhas de Implantação: Sucesso com Afinamento de 1/4 da ZP por Laser

## Implantation Failures: Success of Assisted Hatching with Quarter-Laser Zona Thinning

**Claudia G Petersen**  
**Ana Lucia Mauri**  
**Ricardo L R Baruffi**  
**João Batista Alacântara Oliveira**  
**Fabiana C Massaro**  
**José Gonçalves Franco Jr.**

*Centro de Reprodução Humana Sinhá Junqueira,  
 Ribeirão Preto- SP.  
 Correspondência para:  
 José Gonçalves Franco Jr  
 Centro de Reprodução Humana Sinhá Junqueira  
 Rua D. Alberto Gonçalves, 1500 - CEP 14085-100  
 Ribeirão Preto, SP - Brazil  
 Fone: 55-16-6262909` FAX: 55-16-6283755  
 E-mail- crh@crh.com.br ou franco@crh.com.br*

### ABSTRACT

**Introduction:** The aim of this prospective and randomized study was to evaluate the efficacy of quarter-laser zona thinning assisted hatching (qLZT-AH) in improving the implantation of embryos in patients with previous implantation failure. **Material and Methods:** A total of 150 patients with a history of previous implantation failure were treated with intracytoplasmic sperm injection, and allocated into two groups: group I, only one previous implantation failure, and group II, repeated implantation failures. The patients in each group were randomized at the time of embryo transfer into a control group (no qLZT-AH) or experimental group where qLZT-AH was performed. For patients with repeated implantation failures, the implantation rate in those who received

laser-thinned embryos was significantly higher ( $p=0.02$ ) than in those whose embryos were not laser-thinned (10.9 and 2.6% respectively). However, this difference was not observed in patients who presented with only one previous implantation failure. The data demonstrate that qLZT-AH is an effective strategy for improving the implantation of embryos in patients with repeated implantation failures.

**Keywords:** implantation failure, quarter-laser zona thinning and assisted hatching.

### INTRODUÇÃO

O embrião escapa da zona pelúcida (ZP) no estágio de blastocisto, vários dias depois da fertilização, e inicia então o processo de implantação. O processo de eclosão é alcançado mediante uma combinação de expansões e contrações sucessivas do blastocisto, a qual permite a dissolução e rotura da ZP (Stein et al., 1995). O sucesso da eclosão do embrião é a chave do processo de implantação. O afinamento ou abertura da ZP usando métodos qui-

Recebido: 10/10/2005  
 Aprovado: 12/10/2005

micos, mecânicos, enzimáticos ou a *laser* tem sido usado há uma década para ajudar a eclosão embrionária (Cohen, 1991). Metanálises de estudos randomizados têm demonstrado um significativo benefício dessas metodologias de *assisted hatching* (AH) nas taxas de gravidez e implantação, especialmente para aquelas pacientes com repetidas falhas de implantação (Edi-Osagie et al., 2003; Sallam et al., 2003). Entretanto, os estudos são heterogêneos e não demonstram qual a melhor estratégia para a realização do AH. O objetivo deste estudo foi avaliar de forma prospectiva e aleatória a eficácia do método de afinamento de 1/4 da ZP por *laser* na melhora das taxas de implantação dos embriões de pacientes com falhas prévias de implantação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção das pacientes

Um total de 150 transferências de 150 pacientes que foram admitidas ao programa de ICSI e que apresentavam falha prévia de implantação, no período de janeiro de 2002 a julho de 2003, foi incluído neste estudo. As pacientes foram distribuídas em um dos dois grupos estudados, de acordo com o número de falhas de implantação.

- Grupo I: pacientes que apresentavam apenas uma única falha de implantação; qLZT-AH realizado ou não, de acordo com a randomização.
- Grupo II: pacientes com repetidas falhas de implantação (duas ou mais falhas de implantação); qLZT-AH realizado ou não, de acordo com a randomização.

A determinação sobre se as pacientes foram incluídas no grupo experimental (qLZT-AH) ou no grupo-controle (não qLZT-AH) foi realizada por meio de dupla randomização, utilizando-se primeiro uma tabela pré-elaborada e depois a randomização por sorteio no momento da transferência embrionária. O objetivo primário foi a avaliação da implantação e foi definido como o número de sacos gestacionais visto por ultra-som dividido pelo número total de embriões transferidos. As taxas de gravidez clínica, aborto e partos foram calculadas para cada subgrupo de pacientes. A gravidez foi confirmada com base na presença de saco gestacional com batimento cardíaco por ultra-som na sexta semana após a transferência embrionária. Dados foram analisados pelos testes estatísticos de Whitney e Fisher. O valor  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### Estimulação ovariana, coleta dos oócitos e transferência embrionária

Na estimulação ovariana prévia ao procedimento de ICSI utilizou-se um bloqueio de segunda fase com acetato de leuprolida, na dose de 0,5 mg/dia (Lupron, Abbott) (Franco Jr. et al., 2001). Habitualmente, 14 dias após o uso do análogo e estabelecido o bloqueio iniciou-se o uso de FSH recombinante (Gonal F, Serono),

nas doses de 150 ou 225 UI, pelo período de sete dias. No oitavo dia da estimulação ovariana teve início a monitorização do desenvolvimento folicular somente por ultra-som vaginal, sendo as doses de FSH adaptadas de acordo com a resposta ovariana. Quando no mínimo três folículos com diâmetro  $> 17$  mm foram observados, foi administrada gonadotrofina coriônica humana (hCG) na dose de 10.000 UI. Os oócitos foram coletados dos folículos por meio de punção transvaginal guiada por ultra-som 34-36 horas após hCG.

Os oócitos identificados no fluido folicular foram transferidos para meio pré-equilibrado de P 1/3% de soro albumina (SA) (Irvine) e incubados a 37° C em 5% de CO<sub>2</sub> até a desnudação. O *cumulus-corona* foi removido em 40 UI de hialuronidase (tipo IVS Sigma) em solução de HTF/3%SA tamponado (Irvine). Após a desnudação dos oócitos, estes foram avaliados quanto à maturidade e todos os oócitos em metáfase II (MII) foram submetidos ao procedimento do ICSI de acordo com Svalander et al. (1995). Os oócitos foram incubados em meio P 1/10% SA após o ICSI. Avaliação da fertilização foi realizada após 17-20 horas e os zigotos com dois pronúcleos distintos foram transferidos para nova placa com meio P 1/10%SA pré-equilibrado. Após 25 a 27 horas da injeção dos espermatozoides, a clivagem precoce foi avaliada. Os embriões foram transferidos no dia 2 ou dia 3. A qualidade embrionária foi avaliada em todas as pacientes, de acordo com o seguinte critério: Grau 1, embriões de quatro células no dia 2 ou oito células no dia 3, com blastômeros regulares e sem fragmentação; Grau 2, embriões com ausência de quatro células no dia 2 ou oito células no dia 3 e/ou = 25% de fragmentação; Grau 3, embriões com ausência de quatro células no dia 2 ou oito células no dia 3 e/ou  $> 25\%$  de fragmentação.

### Avaliação da espessura e afinamento de 1/4 da ZP por *laser*

Os embriões foram posicionados para a avaliação da espessura da ZP antes da manipulação com *laser* e da transferência. A medida da espessura da ZP foi realizada em quatro diferentes posições (3, 6, 9 e 12 horas) por meio de microscópio invertido Eclipse TE 300 Nikon, acoplado com lentes Hofman e ocular com régua para medida em micrômetros. O afinamento de 1/4 da ZP foi realizado por meio de 1,48 diodo *laser* (Fertilaser-MTM), com uma luz piloto que operou através de objetiva de 40x acoplada no microscópio invertido Eclipse TE300 Nikon. Os embriões foram tratados diretamente na placa de cultivo (Nunc). A luz do *laser* foi calibrada para um ponto-alvo de um monitor de vídeo. A região-alvo da ZP dos embriões foi posicionada neste ponto-alvo do monitor, onde a luz do *laser* foi irradiada. O afinamento de 1/4 da ZP foi obtido após no mínimo sete irradiações consecutivas de 9 ms, com a irradiação

**Tabela 1:** Características e resultados das pacientes com uma falha de implantação

GRUPO I			
	QLZT-AH (experimento)	Não qLZT-AH (controle)	p
Pacientes(n)	35	35	
Ciclos(n)	35	35	
Idade (anos)	34,6 ± 4,6	34,1 ± 5,3	0,73
Etiologia			
Masculina	17 (48,6%)	12 (34,3%)	
Feminina	5 (14,3%)	13 (37,1%)	
Associação Masc./Fem.	10 (28,5%)	8 (22,9%)	
Idiopática	3 (8,6%)	2 (5,7%)	
Oócitos coletados (n)	9,2 ± 4,5	8,1 ± 4,4	0,16
Oócitos em metáfase II (n)	7,6 ± 3,9	6,5 ± 3,3	0,18
Fertilização (%)	71,2 ± 21,6	73,2 ± 19,7	0,61
Qualidade embrionária			
Grau 1	55 (58%)	47 (50%)	
Grau 2	38 (40%)	41 (44%)	
Grau 3	2 (2%)	6 (6%)	
Espessura da ZP (µm)	16,0 ± 0,7	16,2 ± 0,5	0,17
Embriões transferidos (n)	2,7 ± 0,9	2,7 ± 0,7	0,81
Taxa de implantação (%)	15,8	14,9	0,86
Grávidas (n)	11	10	
Taxa de grav/transf (%)	31,4	28,6	0,79
Abortos (n)	3	0	
Partos (n)	8	10	

iniciada na posição de 9 horas até a posição de 12 horas, atingindo a profundidade de 50 a 80% da ZP. Após o procedimento do afinamento por *laser*, os embriões foram transferidos para novo meio de cultura, a fim de evitar possível toxicidade dos produtos derivada da ação do *laser*.

## RESULTADOS

### Grupo I (Tabela 1)

A **Tabela 1** demonstra as características e os resultados das pacientes com uma única falha de implantação. A idade das pacientes, o número de oócitos coletado e oócitos em MII, a taxa de fertilização, a espessura da ZP do embrião, a qualidade embrionária e o número de embriões transferidos não foram diferentes entre os grupos controle e experimental. Não houve diferença significativa nas taxas de implantação, gravidez e aborto entre os dois grupos.

### Grupo II (Tabela 2)

A **Tabela 2** ilustra as características das pacientes com repetidas falhas de implantação. A idade da paciente, o número de falhas prévias de implantação, o número de oócitos coletado e oócitos em MII, a taxa de fertilização, a espessura da ZP do embrião, a qualidade embrionária e o número de embriões transferidos não foram diferentes entre os grupos controle e experimental. Contudo, diferente mente do grupo I, a implantação dos embriões no grupo experimental (QLZT-AH) foi significativamente maior ( $p = 0,02$ ) em relação ao controle (não QLZT-AH) (10,9% x 2,6%, respectivamente). As taxas de gravidez e aborto não foram diferentes entre os grupos.

## DISCUSSÃO

Pacientes com falha inexplicada de implantação em FIV/ICSI têm chance reduzida de gravidez nos tratamentos subsequentes. Os mecanismos para explicar

**Tabela 2:** Características e resultados clínicos das pacientes com falhas repetidas de implantação

GRUPO II			
	QLZT-AH (experimento)	Não qLZT-AH (controle)	p
Pacientes (n)	40	40	
Ciclos (n)	40	40	
Idade (anos)	35.7 ± 3.8	35.3 ± 5.1	0.92
Etiologia			
Masculina	15 (37.5%)	17 (42.5%)	
Feminina	11 (27.5%)	18 (45%)	
Associação Masc/Fem	10 (25%)	3 (7.5%)	
Idiopática	4 (10%)	2 (5%)	
Falhas de implantação			
=2	16(40%)	22(55%)	
=3	12(30%)	12(30%)	
=4	5(12.5%)	3(7.5%)	
=5	5(12.5%)	2(5%)	
=6	2(5%)	0	
=7	0	1(2.5%)	
Oócitos coletados	9.7 ± 6.1	9.5 ± 5.7	0.88
Oócito em metafase II	8.1 ± 5.2	7.6 ± 3.9	0.96
Fertilização(%)	74.4 ± 20.8	70.9 ± 17.0	0.23
Qualidade embrionária			
Grau 1	48 (40.3%)	53(46.5%)	
Grau 2	56 (47.1%)	54 (47.4%)	
Grau 3	15(12.6%)	7 (6.1%)	
Espessura da ZP (µm)	17.6 ± 2.4	17.2 ± 2.8	0.17
Embrião transferido(n)	3.0 ± 0.9	2.9 ± 0.8	0.8
Grávidas(n)	10	3	
Taxa de implantação(%)	10.9	2.6	0.02
Taxa de grav/transf (%)	25	7.5	0.11
Aborto (n)	1	0	
Partos(n)	9	3	

essas falhas incluem: espessamento da ZP devido a cultura *in vitro*, assincronia entre o embrião e a janela de implantação em pacientes com estimulação ovariana e deficiência de energia necessária para a eclosão (Schoolcraft et al., 1994). Em estudos retrospectivos, as conclusões em relação à utilização do AH em pacientes com falhas prévias de implantação são contraditórias. Alguns sugerem melhora nos resultados (Obruca et al., 1994; Takahashi et al., 1994; Stein et al., 1995; Parikh et al., 1996), enquanto outros não (Edirisinghe et al., 1999). Nos poucos trabalhos randomizados, a variabilidade dos métodos de AH e o pequeno

número de pacientes avaliados tornam difícil a interpretação desses dados, não sendo possível obter conclusão definitiva. Entretanto, metanálises de alguns desses estudos randomizados têm demonstrado um significativo benefício do AH nas taxas de gravidez e implantação, especialmente para pacientes com falha repetidas de implantação. Além disso, recentemente um estudo prospectivo multicêntrico europeu (Primi et al., 2004) sugeriu que a falha de implantação depois de várias transferências de embriões de boa qualidade é um forte critério para a realização do AH. A metodologia do *laser* tem substituído progressivamente

te as demais metodologias de AH, uma vez que permite uma rápida, segura e precisa microdissecção da ZP (Benjamin et al., 2003). Por outro lado, também não existe consenso em relação à definição da melhor estratégia para fazer a abertura da ZP (abertura total x afinamento da ZP). A criação de uma abertura total da ZP é importante para a eclosão do embrião, enquanto o processo de afinamento da ZP a mantém intacta, protegendo o embrião de possíveis contaminações durante a transferência.

O afinamento de uma área maior da ZP (1/4 da ZP) por *laser* tem demonstrado ser efetivo para a eclosão embrionária *in vitro* (Blake et al., 2001). Além disso, tem sido sugerido que embriões com variabilidade na espessura da ZP resultam em maiores taxas de gravidez (Gabielsen et al., 2000 e 2001). Por outro lado, o afinamento de 1/4 da ZP por *laser* tem sido comparado com a metodologia tradicional de AH (abertura total da ZP) e demonstrado maior eficácia nas taxas de implantação e gravidez. Entretanto, tal comparação foi realizada em pacientes que apresentavam um dos seguintes critérios: idade avançada, duas falhas de implantação e/ou pacientes que receberam embriões congelados e descongelados e o estudo não apresentava controle. Nosso estudo mostra uma maior taxa de implantação depois do afinamento de 1/4 da ZP por *laser*, comparada com o controle para as pacientes com falhas repetitivas de implantação. Entretanto, o mesmo não foi demonstrado em pacientes com uma única falha de implantação. Esse fato nos faz pensar que em pacientes com uma única falha de implantação provavelmente exista outro fator, não-embrionário, influenciando a implantação. Na literatura não existem trabalhos que demonstrem a eficácia do AH nessa população específica, de forma que estudos com maior número de pacientes são necessários para tal confirmação. Em conclusão, nossos dados indicam que pacientes com repetidas falhas de implantação são beneficiadas com o afinamento de 1/4 da ZP por *laser*. Como este é o primeiro trabalho que compara a metodologia Q-LZT-AH com um grupo-controle, um número maior de pacientes é necessário para confirmar tal observação.

## RESUMO

**Introdução:** O objetivo deste estudo prospectivo e randomizado foi avaliar a eficácia do *hatching* assistido por afinamento de 1/4 da zona pelúcida (ZP) utilizando *laser* (*quarter-laser zona thinning assisted hatching* - qLZT-AH) na melhora da implantação de embriões em pacientes com falhas prévias de implantação. **Material e Método:** Um total de 150 pacientes, que participaram do programa de ICSI e apresentaram falha prévia de implantação embrionária, foi distribuído em dois grupos: Grupo I, uma falha prévia de implantação; e Grupo II, duas ou mais falhas prévias de implantação. As pacientes em cada grupo foram distribuídas aleatoriamente para receber (grupo experimental) ou não (grupo-controle) qLZT-AH no momento da transferência.

As variáveis espessura da ZP do embrião, qualidade embrionária, implantação e gravidez foram analisadas.

**Resultados:** A implantação de embriões com a ZP afinada por *laser* foi significativamente maior ( $p = 0,02$ ) do que no grupo-controle (10,9 e 2,6%, respectivamente) em pacientes com falhas repetidas de implantação (Grupo II). O mesmo não foi observado nas pacientes que apresentavam apenas uma única falha de implantação (Grupo I). **Conclusão:** O presente dado demonstra que o método de afinamento de 1/4 da ZP por *laser* é eficaz para melhorar a implantação dos embriões de pacientes com falhas repetidas de implantação.

**Unitermos:** falha de implantação, afinamento a *laser* da zona pelúcida, *hatching* assistido.

## REFERÊNCIAS

1. Blake DA, Forsberg AS, Johansson BR, Wikland M. Laser zona thinning: an alternative approach to assisted hatching. *Hum Reprod* 16:1959-1964, 2001.
2. Benjamin CW, Boyd CA and Lanzendorf SE. Randomized controlled study of human zona thinning using the zona infrared laser optical system: evaluation of blastomere damage, embryo development, and subsequent hatching. *Fertil Steril* 80:1249-1254, 2003.
3. Cohen J, Feldberg D. Effects of the size and number of zona thinning openings on hatching and trophoblast outgrowth in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 30:70-78, 1991.
4. Edi-Osagie E, Hooper L, Seif MW. The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception: a systematic review. *Hum Reprod* 18:1828-1835, 2003.
5. Edirisinghe WR, Ahnonkitpanit V, Promviengchai S, Suwajanakorn S, Pruksananonda K, Chinplais V, Virutamasen P. A study failing to determine significant benefits from assisted hatching: patients selected for advanced age, zona thickness of embryos, and previous failed attempts. *J Assist Reprod Genet* 16:294-301, 1999.
6. Franco Jr JG, Baruffi RLR, Coelho J, Mauri AL, Petersen CG, Chufallo JE, Felipe V, Gaberlini E. Prospective randomized comparison of ovarian blockade with nafarelin versus leuprolide during ovarian stimulation with recombinant FSH in an ICSI program. *J Assist Reprod Genet* 18:593-597, 2001.
7. Gabielsen A, Bhatnager PR, Petersen K, Lindenberg S. Influence of zona thinning thickness of human embryo on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod* 17:323-328, 2000.
8. Gabielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona thinning thickness variation on human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod* 16:2166-2170, 2001.
9. Obruca A, Strohmer H, Sakas D, Menzo Y, Kogosowski A, Barak Y, Feichtinger W. Use of lasers in assisted fertilization and hatching. *Hum Reprod* 9:1723-1726, 1994.
10. Parikh FR, Kamat SA, Nadkarni S, Arawandekar D, Parikh RM. Assisted hatching in an in vitro fertilization program. *J Reprod Fertil Suppl* 50:121-125, 1996.
11. Primi MP, Senn A, Montag M et al. An European multicenter prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations. *Hum Reprod* 19:2325-2333, 2004.
12. Sallam HN, Sadek SS, Agameya AF. Assisted hatching - a meta analysis of randomized controlled trials. *J Ass Reprod Genetics* 20:332-342, 2003.
13. Schoolcraft WB, Schlenker T, Gee M, Jones Jr HW. Assisted hatching in the treatment of poor prognosis in vitro fertilization candidates. *Fertil Steril* 62:551-554, 1994.
14. Stein A, Rufas O, Amit S, Avrech O, Pinkas H, Ovadia J, Fisch B. Assisted hatching by partial zona dissection of human pre-embryos in patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 63:838-841, 1995.
15. Svalander P, Forsberg AS, Jakobsson AH, Wikland M. Factors of importance for the establishment of a successful program of intracytoplasmic sperm injection treatment for male infertility. *Fertil Steril* 63:828-837, 1995.
16. Takahashi K, Takenaka M, Ishizuka B. The effect of assisted hatching on patients repeatedly failed to conceive by in vitro fertilization. *Nip S F G Zasshi* 16:1009-1012, 1994.