

## Gemelos monocigóticos dicoriónicos-diamnióticos: entendiendo su fisiopatogenia gracias a las técnicas de reproducción asistida

E Cervantes,<sup>1</sup> G Vela,<sup>1,3</sup> B Sandler,<sup>1,2</sup> V Vallejo,<sup>1</sup> A Copperman,<sup>1,2</sup> M Luna<sup>1</sup>

### RESUMEN

La gemelaridad ha fascinado a los seres humanos a través de los tiempos. Es bien reconocido que esta condición es más prevalente cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida, además, se han identificado varios factores predisponentes. La mayoría de los gemelos obtenidos por medio de estas técnicas son dicigóticos y producto de la transferencia de múltiples embriones por ciclo; sin embargo, la cifra de gemelos monocigóticos también es elevada. El dogma tradicional sugiere que si la división embrionaria ocurre durante el estadio de clivaje (días 1 a 3), los gemelos monocigóticos se implantarán de manera independiente (después de que la zona pelúcida desaparezca), en un proceso similar al de los gemelos dicigóticos; cada gemelo tendrá su propia placenta, su propio corion y su propio amnios. En la mayoría de los casos en estadio de blastocisto, esta división sucede en los días 4 a 8; el polo embrionario se divide por sí solo en el interior del blastocisto y produce dos masas celulares internas. Ambos embriones compartirán el mismo corion y placenta, pero cada uno tendrá su propio amnios. Si este proceso se desarrolla posteriormente (días 8 a 12), entonces los gemelos serán de tipo monocoriónico-monoamniótico. En teoría, el día en que el embrión sufre esta división regulará su corionicidad y amnios. La serie de casos que se aborda difiere de lo que sostiene este dogma, por lo que se sugiere la posibilidad de una división tardía (posterior a la etapa de blastocisto) que resulte en embarazos gemelares monocigóticos independientes, cada uno con su propio corion y amnios.

**Palabras clave:** gemelos monocigóticos dicoriónicos-diamnióticos.

### ABSTRACT

Twinning has fascinated human beings over the centuries. It is well recognized that this condition is increased after assisted reproductive techniques and several factors have been identified that appear to predispose patients to this phenomenon. The majority of twins that occur with assisted reproductive techniques are dizygotic and are a direct result of a multi-embryo transfer. Monozygotic twins, however, appear to also be increased. Traditional dogma suggests that if division of the embryo takes place during the cleavage stage (day 1-3), the monozygotic twins implant themselves separately (after the *zona pellucida* has disappeared), similar to dizygotic twins. Each twin thus has its own placenta, its own chorion and amnion. In the majority of the cases, the division occurs in the blastocyst stage (day 4-8). In these cases, the embryonic bud divides itself in the interior of the same blastocyst cavity into two masses of cells. Both embryos possess the same chorion and the same placenta, but each has its own amnion. If this process occurs afterwards (day 8-12) monochorionic-monoamniotic twins develop. Theoretically, the day the embryo splits will regulate the chorionicity and amnionicity of the pregnancy. Our series of cases, however, do not concur with this dogma. We observed late embryonic splits that resulted in monozygotic pregnancies with two chorions and two amnions.

**Key words:** dichorionic-diamniotic monozygotic twins.

<sup>1</sup> Reproductive Medicine Associates of New York, NY, United States.

<sup>2</sup> Departamento de Ginecología-Obstetricia y Ciencias Reproductivas, Mount Sinai School of Medicine.

<sup>3</sup> Hospital San José de Hermosillo, Hermosillo, Sonora, México.

Correspondencia: Dr. E Cervantes. Reproductive Medicine Associates of New York en México. Prolongación Paseo de la Reforma 1232, colonia Lomas de Bezares, CP 11910, México, DF. Recibido: agosto, 2012. Aceptado: octubre, 2012.

Este artículo debe citarse como: Cervantes E, Vela G, Sandler B, Vallejo V y col. Gemelos monocigóticos dicoriónicos-diamnióticos: entendiendo su fisiopatogenia gracias a las técnicas de reproducción asistida. Rev Mex Reprod 2013;5:142-148.

www.nietoeditores.com.mx

La gemelaridad es un fenómeno común en la especie humana, con una incidencia reportada, entre los diferentes continentes, de alrededor de 1 por cada 40 nacimientos.<sup>1</sup> Además del humano, el armadillo es un ejemplo natural que puede reproducir este fenómeno espontáneamente, reflejado en productos cuádruples y óctuples genéticamente iguales. En otras especies se ha logrado inducir este proceso exponiendo embriones a hipoxia en estadios celulares tempranos o repentinos cambios de temperatura.<sup>1</sup>

La alta incidencia de embarazos gemelares en la fertilización *in vitro* es bien conocida, ya que alcanza

aproximadamente 32%; de ellos, dos tercios son gemelos dicigóticos, producto de la transferencia e implantación de embriones diferentes, y el tercio restante son gemelos monocigóticos. La cigocidad deriva de la cantidad de óvulos fecundados, sin excluir las modificaciones somáticas y los cambios epigenéticos que se generan en cada organismo multicelular.<sup>2</sup> Yovich y colaboradores reportaron el primer embarazo monocigótico por fertilización *in vitro* en 1984; posteriormente, en varios estudios se ha relacionado el incremento en la incidencia de embarazos monocigóticos con esta tecnología.<sup>3</sup> Vitthala y su grupo mencionaron un riesgo 2.25 veces mayor de desarrollar un embarazo monocigótico en tratamientos de fertilización *in vitro* en comparación con embarazos espontáneos. Da Costa y colaboradores relacionaron los cultivos extendidos y la transferencia de embriones en estadios celulares más avanzados, así como la inyección intracitoplasmática de espermia (ICSI) como factores de riesgo.<sup>4,5</sup> Algunas otras revisiones muestran que no hay relación entre los embriones sometidos a eclosión asistida y la incidencia de estos embarazos.<sup>6</sup>

La causa natural de este mecanismo aún se desconoce; sin embargo, se le adjudica un papel a la zona pelúcida. Esta capa acelular de mucopolisacáridos que es sintetizada por el óvulo desde estadios celulares tempranos, aparte del mecanismo protector de polispermia, provee un efecto mecánico de barrera, limitando la extensión o fusión de la masa celular interna.<sup>7</sup> Algunos estudios han destacado una zona pelúcida más delgada según la edad materna, lo que puede ser un factor importante durante el proceso de eclosión asistida o natural, ya que permite al embrión protruir en múltiples zonas.<sup>8</sup>

Los gemelos monocigóticos se clasifican de acuerdo con su corionicidad (número de placentas) y amniocidad (número de sacos amnióticos). Teóricamente, mientras más temprano ocurra la división, posterior a la fertilización, cada embrión podrá desarrollarse y dividirse de manera independiente. Si la división sucede durante los primeros tres días de clivaje, se obtendrán gemelos monocigóticos dicoriónicos-diamnióticos prácticamente indistinguibles de los dicigóticos, generando dos coriones (placentas) y dos amnios. Si dicha división ocurre del día 4 al 8 de vida embrionaria, se obtendrán gemelos monocigóticos monocoriónicos-diamnióticos tras la división de la masa celular interna, y se formarán

dos embriones, cada uno dentro de un saco amniótico, que compartirán un corion en común, modelo más frecuente de gemelos monocigóticos. Si esta división ocurre entre los días 8 y 12 de vida embrionaria, se obtendrán gemelos monocigóticos monocoriónicos-monoamnióticos a consecuencia de un trofotodermo que no logró su separación completa, caracterizados por dos embriones dentro de un mismo saco amniótico que comparten un corion. Si la división se lleva a cabo tardíamente, después del día 12, la masa celular interna no se separará completamente, generando gemelos siameses. Esta teoría, reportada en gran parte de la bibliografía, difiere de algunos casos de reproducción asistida, en los cuales, después de transferir embriones en estadios celulares más avanzados (día 5 o 6 de la concepción), se observa la implantación de un número mayor de sacos gestacionales (embarazo gemelar dicoriónico diamniótico).<sup>9</sup>

El objetivo de este reporte es dar a conocer que el origen de embarazos monocigóticos dicoriónicos-diamnióticos no se debe sólo a divisiones embrionarias tempranas (día 3 de desarrollo embrionario). Se describen cinco casos de embarazos gemelares monocigóticos dicoriónicos-diamnióticos, producto de ciclos de fertilización *in vitro* o de ciclos de ovodonación con transferencia en fresco de blastocistos sin eclosión asistida, cuya identificación fue posible mediante la evidencia ultrasonográfica de un mayor número de sacos gestacionales con embriones viables al número de embriones transferidos.

## CASOS CLÍNICOS

### Caso 1

Febrero, 2004. Paciente de 38 años de edad con diagnóstico de infertilidad por azoospermia no obstructiva de la pareja y disminución de la reserva ovárica con concentraciones basales de hormona foliculoestimulante en 18 y 22 mUI/mL. Antecedente de inseminaciones intrauterinas con espermia donado en ciclos naturales, y en dos ciclos con menotropinas con escasa respuesta. A su llegada al centro, se le diagnosticó mioma submucoso de 4 cm, que se manejó histeroscópicamente. Se le realizó un ciclo de ovodonación con espermia donado. Se transfirieron dos blastocistos el día 5, grados 4AB y 5AB

(clasificación de Gardner, 1990). Durante el seguimiento del embarazo, se visualizaron inicialmente dos sacos gestacionales mediante ultrasonografía transvaginal, y en la consulta subsecuente se identificaron tres sacos gestacionales con saco vitelino, polo embrionario y latido cardíaco. En la siguiente consulta se detectó la ausencia de latido cardíaco en uno de los embriones, por lo que se refirió a la paciente, a las 9.6 semanas de embarazo, con su obstetra, quien le practicó una cesárea a las 36.6 semanas, mediante la cual se obtuvieron un producto femenino y uno masculino de 2,760 y 2,086 g, respectivamente, sin complicaciones aparentes.

### Caso 2

Abril, 2009. Paciente de 31 años de edad con diagnóstico de infertilidad secundaria idiopática de dos años de evolución. Se le realizó ciclo de fertilización *in vitro* con protocolo largo de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), y se le transfirieron dos embriones en estadio de blastocisto (4AA, 4AB). A los 19 días de la transferencia, se identificaron dos sacos gestacionales mediante ultrasonido vaginal; en la consulta de seguimiento se observaron tres sacos gestacionales con adecuado desarrollo embrionario y viabilidad. Se informó a la paciente de los riesgos vinculados con este tipo de embarazo y se le refirió con el especialista en medicina materno-fetal para una reducción multifetal a las 13.5 semanas de embarazo. Se interrumpió el embarazo a las 29.6 semanas debido a rotura prematura de membranas. Se obtuvieron dos productos del sexo masculino, uno de 1,088 g y el otro de 960 g, que sobrevivieron sin secuelas.

### Caso 3

Septiembre, 2004. Paciente de 31 años de edad, con un embarazo y un parto previos, tenía infertilidad secundaria y diagnóstico de oligoespermia severa, con antecedente de embarazo obtenido por estimulación ovárica con citrato de clomifeno e inseminación intrauterina con espermia donado. Después de cinco ciclos de estimulación con citrato de clomifeno más inseminación intrauterina y dos ciclos de estimulación ovárica controlada con menotropinas e inseminación intrauterina sin éxito, se le realizó ciclo de fertilización *in vitro* con espermia donado bajo protocolo con antagonistas de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Se le transfirieron dos embriones en estadio de

blastocisto (5AA, 4AB), y se corroboró la visualización de dos sacos gestacionales intrauterinos. A los 32 días de la transferencia, se identificaron tres sacos con viabilidad embrionaria. En la consulta de seguimiento se comprobó ausencia de latido cardíaco en uno de los productos, de manera espontánea. Se le dio de alta del servicio de Endocrinología Reproductiva a las 8.4 semanas de embarazo y a las 37.1 semanas, por vía cesárea, se obtuvieron un producto femenino y uno masculino de 2,775 y 2,317 g, respectivamente.

### Caso 4

Mayo, 2011. Paciente de 31 años de edad, con dos gestaciones y dos partos previos electivos, diagnosticada con disminución de la reserva ovárica. Se le realizó ciclo de fertilización *in vitro* con protocolo de antagonista de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y transferencia de embrión único, a petición de la pareja, para disminuir el riesgo de embarazo gemelar. Se transfirió un embrión clasificado 5AB; a los siete días de la prueba positiva se observó, por medio de ultrasonido vaginal, implantación única de saco gestacional. Una semana después, se identificaron dos sacos gestacionales intrauterinos con actividad cardíaca. Se refirió con su obstetra a las 8.2 semanas de embarazo, y a las 13.2 semanas se le hizo una reducción multifetal. Se le practicó cesárea a las 39 semanas por placenta previa total, en la que se obtuvo producto único vivo del sexo femenino, con peso de 2,771 g, sin complicaciones.

### Caso 5

Julio, 2011. Paciente de 38 años de edad, con diagnóstico de disminución de la reserva ovárica, a quien se le habían efectuado dos ciclos de fertilización *in vitro* sin éxito. Se le realizó un ciclo de ovodonación mediante el cual se le transfirieron dos embriones en estadio de blastocisto (5AB, 5AA). En la prueba de embarazo se identificaron dos sacos gestacionales intrauterinos, y en el ultrasonido de seguimiento se observaron tres sacos con actividad cardíaca. Se le refirió con un especialista en medicina materno-fetal a la semana 12, quien decidió efectuar una reducción multifetal. La evolución fue favorable, y mediante cesárea, a las 37.5 semanas de gestación, se obtuvieron dos productos del sexo masculino, uno con peso de 2,771 g y el otro de 2,902 g, sin complicaciones.

En el Cuadro 1 se muestra información más detallada de cada ciclo.

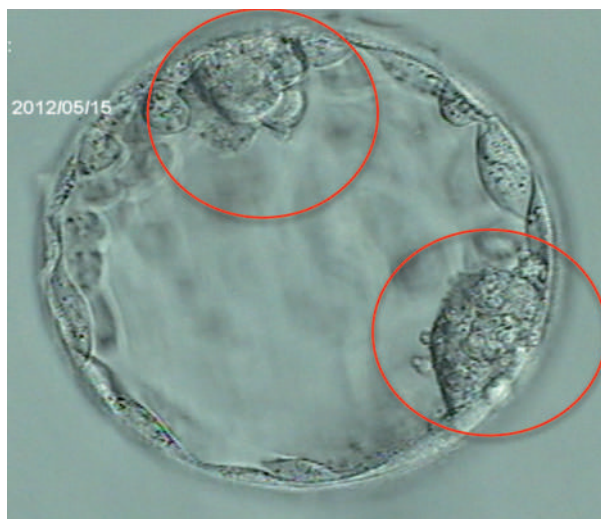
Cuadro 1.

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Edad	38	31	30	31	38
Antecedente obstétrico	E1 A1	G 2 E1 EE1	E1 P1	E2, 2 electivos	E1 A1
Diagnóstico	Azoospermia no obstructiva	Idiopática	Factor masculino severo	Disminución de la reserva ovárica	Disminución de la reserva ovárica
Protocolo de estimulación	Ovodonación-sincronización sintética	Regulación a la baja	Antagonista	Antagonista	Ovodonación-sincronización sintética
Edad ovular en años	25	31	30	31	26
FSH día 3 (mUI)	N/A	4.7	6.4	8.9	N/A
Pico de E2 el día de hCG (pg/mL)	NA	4,419	3,000	1,949	NA
Muestra espermática	Donador	Compañero íntimo	Donador	Compañero íntimo	Compañero íntimo
Número de óvulos obtenidos	12	19	19	18	17
Método de fertilización	Convencional	Convencional	Convencional	Convencional	ICSI
Tasa de fertilización	7/12 (58%)	8/19 (42%)	9/19 (47%)	2/18 (66%)	11/17 (64%)
Número de ET	2	2	2	1	2
Clasificación de embriones (Gardner 1990)	4 AB, 5 AB	5 AA, 4 AB	5 AA, 4 AB	5 AB	5 AB, 5 AA
Criopreservación	4 blastocistos	2 blastocistos	4 blastocistos	4 blastocistos	5 blastocistos
B- hCG mUI/mL a los 9 días post TE	441	219	169	164	350
B- hCG mUI/mL a los 11 días post TE	1,770	490	437	347	812
Estructuras/concentración $\beta$ -hCG, mUI/mL	SG SV PF FC beta	SG SV PF FC beta	SG SV PF FC beta	SG SV PF FC beta	SG SV PF FC beta
UTV a los 18 $\pm$ 2 días post TE	2 2 1,770	3 2 4,438	2 3,806	1 3,507	2 22,503
UTV a los 25 $\pm$ 2 días post TE	3 3 3 43,013	3 3 3 22,428	/ / /	2 2 2 14,099	3 3 3 17,077
UTV a los 32 $\pm$ 4 días post TE	3 3 3 2 246,359	3 3 3 74,111	3 3 3 57,604	2 2 2 53,490	/ / / /
UTV a los 39 $\pm$ 4 días post TE	3 3 3 2 314,993	14,153	3 2 2 172,466	2 2 2 13,750	3 3 3 273,499
UTV a las 46 $\pm$ 8 días post TE y alta	3 3 3 2 273,245				
Fetorreducción espontánea o inducida	Espontánea	Fetorreducción	Espontánea	Fetorreducción	Fetorreducción
Nacimiento	36.6 SDG	29.6 SDG	37.1 SDG	39 SDG	37.5 SDG
Vía de nacimiento	Cesárea	Cesárea	Cesárea	Cesárea	Cesárea
Sexo	Femenino-masculino	Masculino-masculino	Masculino-femenino	Femenino	Masculino-masculino

E: embarazos; A: abortos; EE: embarazo ectópico; E2: estradiol; P: partos; hCG: hormona gonadotrofina coriónica humana; T: embriones transferidos; TE: transferencia de embriones;  $\beta$ -hCG: fracción beta de hormona gonadotrofina coriónica humana; SV: saco vitelino; PF: polo fetal; FC: frecuencia cardiaca.

## DISCUSIÓN

Los embarazos monocigóticos, fuera de la reproducción asistida, se consideran un evento aislado y poco frecuente. Resulta difícil poder establecer una prevalencia en embarazos espontáneos, a pesar de contar con informes que indican una incidencia de 0.4 a 0.45% en la población general.<sup>2</sup> Un sesgo importante en este porcentaje se debe, seguramente, a la falta de control prenatal temprano y de registros del primer trimestre; aun si se contara con ellos, es probable que un gran número de estos productos pase inadvertido y la cigocidad se adjudique erróneamente a una imagen y se relacionen las clásicas características de gemelos monocigóticos con los productos monocoriónicos monoamnióticos por las estructuras sencillas de visualizar. Al considerar que reproducir monocigocidad es un evento complejo y que pocas especies pueden realizarlo, se cuenta con algunos reportes que soportan este mecanismo observado *in vitro*; entre ellos, la visualización directa de dos masas celulares internas en polos opuestos después del colapso y expansión del blastocisto: en el otro extremo del embrión prolifera una masa celular interna o, como se mencionó, defectos en la zona pelúcida, con herniación de la masa celular interna y división del embrión (Figura 1).<sup>10</sup>



**Figura 1.** Visualización de dos masas celulares internas en un embrión en estadio de blastocisto. Cortesía de la Maestra Marlena Duke, directora de Laboratorio RMA de Nueva York.

Hace poco, Shibuya y su grupo reportaron el primer nacimiento de productos monocigóticos dicoriónicos-diamnióticos posterior a la transferencia de un blastocisto vitrificado y visualización de división en la masa celular interna y el trofotodermo.<sup>11</sup> Ésta es la primera serie de casos que pone en evidencia un potencial mecanismo de división embrionaria distinto al universalmente aceptado. A pesar de que en los cinco casos comunicados se transfirieron blastocistos morfológicamente normales (sin datos de división cigótica), el resultado fue la implantación de dos embriones totalmente independientes. De acuerdo con el dogma, esto es teóricamente imposible en divisiones posteriores a la etapa de blastocisto. De los cinco casos reportados, dos de ellos corresponden a ovodonación, lo que descarta la posibilidad de obtener un embarazo espontáneo e implantación simultánea. Esta posibilidad no puede desecharse del todo en ciclos frescos de fertilización *in vitro* con óvulos propios, independientemente del diagnóstico de la paciente.

En el seguimiento de los casos 1 y 3, después de la visualización de la frecuencia cardíaca, con una diferencia de  $7 \pm 4$  días, se redujo de manera espontánea uno de los productos, que correspondió al producto del mismo sexo, al compararlo con el sexo obtenido. En un estudio realizado en este centro, en el que se analizaron embarazos monocigóticos y monocigóticos de alto orden fetal, Vela y su grupo refirieron que 38.5% de los casos sufría una reducción espontánea, y determinaron que el embrión adicional en los embarazos monocigóticos de alto orden fetal era el que protegía el embarazo de una pérdida completa.<sup>12</sup> En reproducción asistida y en embarazos espontáneos, una cantidad considerable de productos monocigóticos debe pasar inadvertida, esto al visualizar segundos o terceros sacos gestacionales y conferirlos automáticamente a gemelos dicigóticos e, incluso, justificar el mal pronóstico en alguno de ellos a un segundo saco gestacional con aneuploidía. Stephen y colaboradores evaluaron una serie de embarazos gemelares y cuestionaron su pronóstico en relación con la placentación o cigocidad. Establecieron la cigocidad amplificando 12 marcadores microsatélites en 12 cromosomas de sangre del cordón umbilical, y comprobaron un mejor pronóstico en embarazos dicigóticos y monocigóticos dicoriónicos al compararlos con los monocigóticos monocoriónicos, destacando que el resultado se relacio-



na con la placentación y no con la cigocidad.<sup>13</sup> La edad promedio de las cinco pacientes fue de 33.6 años —en algunos estudios se reporta como factor pronóstico de monocigóticos tener más de 35 años— y en todos los ciclos se logró criopreservar embriones como característica común.<sup>14</sup> Los diferentes medios de cultivo y el injustificado uso de inyección intracitoplasmática de esperma han incrementado la incidencia de este tipo de productos. Skiadas y colaboradores identificaron como factores de riesgo de embarazos monocigóticos, la eclosión asistida, la inyección intracitoplasmática de esperma y la transferencia de embriones en el día 5; los riesgos fueron mayores cuando el ciclo ameritaba inyección intracitoplasmática de esperma y transferencia de embriones en estadio de blastocisto.<sup>15</sup> A diferencia de este reporte, en nuestra serie de casos únicamente en uno de ellos se utilizó inyección intracitoplasmática de esperma. En este centro, la eclosión asistida se realiza sólo en los embriones que se transfieren en el día 3. Como parte del protocolo, en todos los embarazos de alto orden fetal (con más de tres fetos) se recomienda una reducción multifetal. Las pacientes son referidas a un especialista en medicina materno-fetal, quien, tras una consulta y plática extensa sobre el riesgo y beneficio del procedimiento, hace un ultrasonido para valorar de manera exhaustiva a los fetos y descartar datos ultrasonográficos de aneuploidía (translucencia nual mayor de 3 mm y ausencia de hueso nasal). Al feto con mejor acceso óptico, y bajo la guía de un transductor transabdominal, se le introduce una aguja de 20 mm para aspirar el líquido amniótico y colapsar el saco gestacional. Posteriormente, se inyecta de manera intratorácica cloruro de potasio (KCl). Después de 90 minutos se verifica la viabilidad de los otros fetos y la ausencia de latido cardíaco en el feto seleccionado. Este procedimiento se recomienda médicamente con base en el resultado perinatal favorable relacionado con la reducción a un embarazo gemelar. Vela y colaboradores reportaron una tasa de llevarse un recién nacido a casa en 100% de los casos a los que se les efectuó una reducción multifetal, a diferencia de 50% de los casos en los que no se hizo.<sup>12</sup> En tres de las pacientes se realizó una reducción multifetal, en dos de ellas se redujo el embarazo triple a un embarazo gemelar y en una se redujo el embarazo gemelar a un solo producto. Se obtuvieron recién nacidos vivos,

sólo en el caso 2 hubo prematuridad, lo que hizo necesario recurrir a la unidad de cuidados intensivos neonatales.

## CONCLUSIÓN

Ésta es la primera serie de casos reportada de gemelos monocigóticos dicoriónicos-diamnióticos transferidos en estadio de blastocisto. A pesar de que el número de casos es limitado y el diagnóstico definitivo se establece mediante estudios genéticos de los recién nacidos, el origen de este tipo de embarazos es cuestionable. Pueden deberse a una masa celular interna con diferentes propiedades, a predisposición epigenética del embrión, a la alteración de la zona pelúcida o a un proceso fisiológico que, incluso, es ajeno a la reproducción asistida. La casuística aquí expuesta cuestiona el dogma universal de la división cigótica e invita a investigaciones futuras que permitan entender mejor la fisiopatogenia de este fascinante proceso.

Agradecemos al coordinador en investigación de RMA de Nueva York, Joseph Lee.

## REFERENCIAS

1. Hall JG. Twinning. *Lancet* 2003;362:735-743.
2. Aston KL, Peterson CM, Carrel DT. Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. *Reproduction* 2008;136:377-386.
3. Yovich JL, Stanger JD, Grauberg A, Barter RA, et al. Monozygotic twins from *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1984;41:833-837.
4. Vitthala S, Gelbaya TA, Brison DR, Fitzgerald CT, Nardo LG. The risk of monozygotic twins after assisted reproductive technology: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009;15:45-55.
5. da Costa ALE, Abdelmassih SA, de Oliveira FG, Abdelmassih V, et al. Monozygotic twins and transfer at the blastocyst stage after ICSI. *Hum Reprod* 2001;16:333-336.
6. Das S, Blake D, Fraquhar C, Seif MMW. Assisted hatching on assisted conception (IVF and ICSI) review. *The Cochrane database of Systematic Reviews* 2009. ISSUE 2 Ast: No: CD001894.
7. Alikani M, Noyes N, Cohen J, Rosenwaks Z. Monozygotic twinning in human is associated with the zona pellucida architecture. *Hum Reprod* 1994;9:1318-1321.
8. Cohen J, Alikani M, Towbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992;7:685-691.

9. Carlson BM. Human embryology and developmental biology. 4<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby, 2009;54-55.
10. Payne D, Okuda A, Wakatsuki Y, Takeshita C, et al. Time-lapse recording identifies human blastocysts at risk of producing monozygotic twins. Hum Reprod 2007;22:i9-i10.
11. Shibuya Y, Kyono K. A success birth of healthy monozygotic dichorionic diamniotic (DD) twins of the same gender following a single vitrified-warmed blastocyst transfer. J Assist Reprod Genet 2012;29:255-257.
12. Vela G, Luna M, Barrit J, Sandler B, Copperman A. Monozygotic pregnancies conceived by *in vitro* fertilization; understanding their prognosis. Fertil Steril 2011;95:606-610.
13. Stephen G, Carroll M, Teyfield L, Reeve L, et al. Is zygosity or chorionicity the main determinant of fetal outcome in twin pregnancies? Am J Obstet 2005;193:757-761.
14. Abusheika N, Salha O, Sharma V, Brinsden P. Monozygotic twinning and IVF/ICSI treatment: a report of 11 cases and review of literature. Hum Reprod 2000;6:396-403.
15. Skiadas C, Missmer S, Benson C, Gee R, Racowsky C. Risk factor associated with pregnancies containing a mono-chorionic pair following assisted reproductive technologies. Human Reprod 2008;23:1366-1371.