



U N I V E R S I D A D E
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
ESCOLA DE PSICOLOGIA E CIÊNCIAS DA VIDA
MESTRADO EM EMBRIOLOGIA E REPRODUÇÃO HUMANA

EXISTE RELAÇÃO ENTRE O TRATAMENTO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E A GRAVIDEZ GEMELAR MONOZIGÓTICA?

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre
em Embriologia e Reprodução Humana, orientada pela Professora Doutora Patrícia
Rodrigues

Tânia Raquel do Nascimento Rua, nº22207539

2024



U N I V E R S I D A D E
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
ESCOLA DE PSICOLOGIA E CIÊNCIAS DA VIDA
MESTRADO EM EMBRIOLOGIA E REPRODUÇÃO HUMANA

EXISTE RELAÇÃO ENTRE O TRATAMENTO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E A GRAVIDEZ GEMELAR MONOZIGÓTICA?

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa no dia 16/01/2024 perante o júri nomeado pelo Despacho de Nomeação nº1029, de 2024, com a seguinte composição:

Presidente: Prof^o Doutora Marta Sofia Peixe Carepo, por delegação da Diretora do ciclo de Estudos;

Arguente: Prof. Doutor Bruno Daniel da Costa Gomes;

Orientadora: Prof^o Doutora Patrícia Carla Coelho Rodrigues

Tânia Raquel do Nascimento Rua, nº22207539

2024

Agradecimentos

Quero agradecer à professora Patrícia Rodrigues, coordenadora deste mestrado, minha orientadora de estágio e também desta dissertação. Esteve sempre disponível e com uma palavra amiga, sempre encorajadora e com várias estratégias para não desistir. Foi, sem dúvida, a pessoa que mais contribuiu para a finalização deste trabalho. O meu muito obrigado.

Agradeço à clínica CEMEARE por me ter recebido tão bem e por me ter cedido os seus dados.

Agradeço aos meus amigos, que sempre me incentivaram a terminar este mestrado.

Agradeço aos meus pais, pessoas mais importantes da minha vida, que me ajudaram com a minha filha para que pudesse ter tempo para estudar.

Resumo

As técnicas de reprodução assistida têm evoluído ao longo dos anos para lidar com a infertilidade, mas a gravidez múltipla continua a ser uma complicação relevante. Uma das estratégias para reduzir esse risco é a seleção de embriões e a transferência de apenas um. No entanto, a incidência de gestações monozigóticas é mais alta em gestações resultantes de reprodução assistida em comparação com concepções naturais. Isso pode ser atribuído a fatores como a estimulação ovárica, cultura prolongada de embriões e à eclosão assistida artificial. Mulheres mais jovens com embriões de qualidade são mais propensas a gestações monozigóticas, e a transferência de blastocisto é um fator de risco importante.

Os gêmeos monozigóticos resultam de um único óvulo fecundado que se divide, são geneticamente idênticos e podem partilhar a mesma placenta e/ou sacos amnióticos. O grau de compartilhamento placentário afeta o risco de complicações. Gestações monozigóticas estão associadas a complicações obstétricas como aborto, parto prematuro, baixo peso ao nascer e defeitos congênitos.

Esta dissertação tem como objetivo investigar se os tratamentos de reprodução assistida têm influência na gravidez gemelar monozigótica e avaliar os dados recolhidos da clínica CEMEARE dos quais resultaram gravidezes gemelares monócóricas.

Palavras-chave: gravidez gemelar; monozigótico; monócórico; técnicas de reprodução assistida, blastocisto.

Abstract

Assisted reproductive technologies have evolved over the years to address infertility, but multiple pregnancies remain a significant complication. One strategy to reduce this risk is the selection of embryos and the transfer of just one. However, the incidence of monozygotic pregnancies is higher in assisted reproduction cases compared to natural conceptions. This may be attributed to factors such as ovarian stimulation, prolonged embryo culture, and artificial assisted hatching. Younger women with high-quality embryos are more likely to have monozygotic pregnancies, and blastocyst transfer is an important risk factor.

Monozygotic twins arise from a single fertilized egg that divides itself, and they are genetically identical. They may share the same placenta and/or amniotic sacs. The extent of placental sharing influences the risk of complications. Monozygotic pregnancies are associated with obstetric complications such as miscarriage, premature birth, low birth weight, and congenital defects.

This dissertation aims to investigate whether assisted reproductive treatments influence monozygotic twin pregnancies and evaluate the data collected from the CEMEARE clinic, focusing on cases resulting in monochorionic twin pregnancies.

Keywords: twin pregnancy; monozygotic; monochorionic; assisted reproductive technologies; blastocyst

Lista de Siglas e Abreviaturas

- **AH** Hatching Assistido
- **DC** Dicoriónica
- **DCDA** Gestação Dicoriónica-Diamniótica
- **DNA** Ácido Desoxirribonucleico
- **DZT** Dizigótico
- **FIV** Fertilização *in vitro*
- **FSH** Follicle Stimulating Hormone
- **GnRH** Gonadotropin Releasing Hormone
- **hCG** human Chorionic Gonadotropin
- **ICSI** Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides
- **ICSI – DO** Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides de oócitos de dadora
- **MC** Monocoriónica
- **MCDA** Gestação Monocoriónica-Diamniótica
- **MCI** Massa Celular Interna
- **MCMA** Gestação Monocoriónica-Monoamniótica
- **MZT** Monozigótico
- **PGT** Teste Genético Pré-implantatório
- **PGT-M** Teste genético pré-implantação para detetar defeitos monogênicos
- **PMA** Procriação medicamente assistida
- **TAPS** Sequência de Anemia Policitemia Gemelar
- **TEC** Transferência de Embrião Congelado
- **TLM** Time-Lapse Monitoring
- **TRA** Técnicas de Reprodução Assistida
- **TRAPS** Sequência de Perfusão Arterial Reversa
- **TTTS** Síndrome de Transfusão
- **ZP** Zona Pelúcida

Índice Geral

Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract	8
Lista de Siglas e Abreviaturas	9
Índice Geral	10
Índice de Tabelas	11
Índice de Figuras	11
Capítulo I	12
Introdução	12
1.1 Gravidez gemelar monocoriônica	13
1.2 Processo celular para a formação de monozigóticos	17
1.3. Objetivos	18
Capítulo II	19
2.1 Estimulação Ovária	20
2.2 Idade Materna	20
2.3 Fatores Genéticos e Epigenéticos	21
2.4 Laboratório:	22
2.4.1 Meios de Cultura e Cultura Prolongada	22
2.4.2. Técnicas de micromanipulação	23
2.4.3 Transferência de Embriões Congelados	25
2.5 Complicações dos Gêmeos Monozigóticos	26
Capítulo III	28
CEMEARE	28
3.1. Materiais	29
3.2 Discussão	30
Capítulo IV	32
Conclusão	32
Referências Bibliográficas	34

Índice de Tabelas

Tabela 1	29
Tabela 2	29

Índice de Figuras

Figura 1.....	14
Figura 2.....	16

Capítulo I

Introdução

1.1 Gravidez gemelar monocoriônica

A Tecnologia de Reprodução Assistida (TRA). tem evoluído positivamente para responder e lidar com a infertilidade, no entanto, a gravidez múltipla é considerada uma complicação grave. A cultura prolongada com seleção embrionária e transferência selecionada de embriões únicos é atualmente reconhecida como o meio mais eficaz de reduzir essa complicação (Busnelli et al., 2019). Contudo, a incidência de gestações múltiplas continua a crescer e diversos estudos demonstram que a incidência de gestações gemelares monozigóticas (MZT) concebidas por TRA é significativamente maior do que a de gestações gemelares monozigóticas concebidas naturalmente, assim como estão associadas a um risco aumentado de complicações obstétricas, tais como aborto espontâneo, parto prematuro, mortalidade perinatal, baixo peso ao nascer e defeitos congênitos (Blickstein et al., 1999; Derom et al., 2006; Liu et al., 2018; Couck et al., 2020; Shi et al., 2021; Liu et al., 2024).

A transferência de dois ou mais embriões na TRA pode dar origem a gémeos dizigóticos (DZT) que provêm de dois oócitos fecundados e são caracterizados como gestação dicoriônica-diamniótica (DCDA). Por outro lado, os gémeos monozigóticos surgem a partir de um único oócito fecundado que se divide em dois embriões, resultando em gémeos que compartilham o mesmo material genético (Lin et al., 2024). A estrutura da placenta desempenha um papel crucial nos desfechos das gestações de gémeos MZT, uma vez que as complicações estão amplamente relacionadas ao grau de compartilhamento placentário entre os gémeos. A configuração placentária pode variar desde sacos amnióticos e córion completamente separados até um único saco amniótico e córion compartilhado por ambos (Aston et al., 2008). Dependendo do momento da divisão do zigoto e subsequente organização da placenta e das membranas fetais, podemos classificar a gestação de três formas (Figura 1.):

- Gestação Dicoriônica-Diamniótica (DCDA): ocorre quando a divisão do embrião acontece dentro dos primeiros três a quatro dias após a fertilização, antes da formação do blastocisto. Cada gémeo desenvolve a sua própria placenta e saco amniótico, o que é semelhante aos gémeos dizigóticos. Este é o tipo de geminação mais comum, representando 25-30% e é a menos suscetível a complicações comparando com os outros tipos;
- Gestação Monocoriônica-Diamniótica (MCDA): Acontece quando a divisão do embrião ocorre entre o quarto e o oitavo dia após a fertilização, após a formação do blastocisto, mas antes da formação da cavidade amniótica. Os gémeos compartilham a placenta, mas têm

membranas separadas. Este é o tipo mais comum de geminação MZT, representando cerca de 70-75% das gestações monozigóticas. Têm um risco aumentado de complicações devido ao compartilhamento da placenta.

- Gestação Monocoriônica-Monoamniótica (MCMA): A divisão do embrião ocorre entre o nono e o décimo segundo dia após a fertilização, após a formação do saco amniótico. Os gêmeos compartilham tanto a placenta quanto o saco amniótico. Este tipo é raro, ocorrendo em cerca de 1-2% das gestações monozigóticas e está associado ao maior risco de complicações, como enrolamento do cordão umbilical e morte fetal.

Controverso entre os autores se se considera uma quarta forma, os gêmeos conjugados ou siameses: Acontece quando a divisão do embrião ocorre após o décimo segundo dia da fertilização e é incompleta, resultando em gêmeos que permanecem fisicamente conectados em alguma parte do corpo. A localização e o grau de conexão variam, e os gêmeos podem partilhar órgãos vitais (Sobek et al., 2016; Wohlmuth et al., 2016).

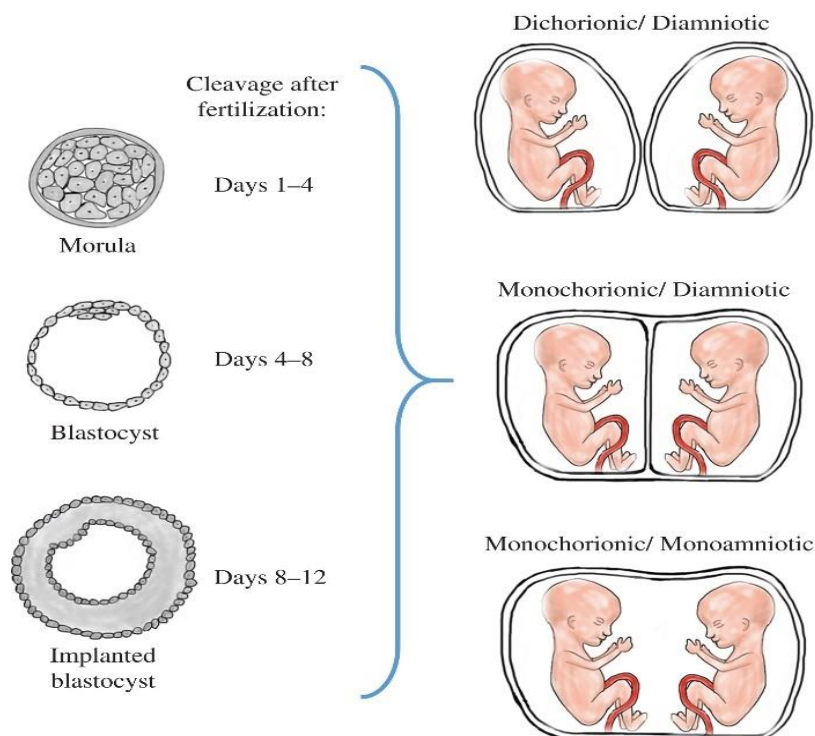


Figura 1:

Desenho esquemático que mostra os três diferentes tipos de gêmeos monozigóticos e as suas possíveis origens. Adaptado de Haviid te al., 2018.

Com base no Dogma de Corner de 1955 (Corner, 1955), a transferência de blastocisto único só poderia resultar em gravidez gemelar monocoriônica. Portanto, a ocorrência de uma gravidez gemelar diamniótica dicoriónica após uma única transferência de blastocisto é considerada uma gravidez dizigótica resultante da transferência de

blastocisto e fertilização natural concomitante. Em 2013, Kyono e colaboradores provaram a monozigosidade de uma gravidez gemelar diamniótica dicoriónica após a transferência de um único blastocisto por impressão digital de DNA (Kyono, 2013), questionando o dogma original e sugerindo que um blastocisto pode dividir-se espontaneamente no útero. No entanto, falta prova genética de que a gravidez veio do blastocisto transferido e não de uma fertilização natural concomitante.

Mais recentemente, um estudo, com recurso a testes genéticos, estimou que metade das gestações gemelares diamnióticas dicoriónicas após a transferência de um único embrião são monozigóticas. Isso indica que a ocorrência de gestações gemelares monozigóticas DCDA por transferência de blastocisto único foi o resultado de um blastocisto dividido, por outro lado, as gestações gemelares dizigóticas DCDA por transferência de blastocisto único, foram gestações que ocorreram devido à ovulação natural e transferência simultânea do blastocisto (Konno et al., 2020). (Figura 2.)

Em 2022, foi diagnosticada uma gravidez gemelar DCDA após uma única transferência de embrião após teste genético pré-implantação para detetar defeitos monogênicos (PGT-M). para displasia espondiloepifisária. Este estudo forneceu provas moleculares de que uma única transferência de blastocisto pode resultar em uma gravidez gemelar diamniótica dicoriónica monozigótica. Este estudo avaliou o estado genético dos gémeos usando diagnóstico pré-natal não invasivo por exclusão da variante paterna em ambos os fetos e estudou a concordância genética entre os gémeos e o blastocisto transferido (Brouillet et al., 2022).

Um outro caso relatou uma gravidez gemelar DCDA após uma única transferência de blastocisto após a técnica de ICSI, confirmada na triagem do primeiro trimestre. Foi realizado um ciclo de transferência de embrião congelado regulado negativamente com supressão da ovulação e houve ausência de um folículo dominante nos ovários, o que foi confirmado com monitorização por ultrassom, o que significa que nenhuma concepção concomitante poderia ocorrer. Realizaram análise genética pós-parto que confirmou que os gémeos eram de facto monozigóticos (Semrl et al., 2023).

Em 2000 e 2003, Van Langendonck et al. e Behr e Milki, respetivamente já teriam descrito um blastocisto dividido in vitro em dois blastocistos separados, ambos com trofoectoderme visível e massa celular interna, o que pode ser um possível mecanismo de geminação monozigótica. No entanto, este processo, não pode explicar a incidência de gémeos monocoriónicos, que são o tipo mais frequente de gravidez gemelar monozigótica relatada após a fertilização in vitro, porque a presença de um único córion implicaria na divisão de uma massa celular interna dentro de uma única trofoectoderme (Van Langendonck et al., 2000; Behr & Milki, 2003).

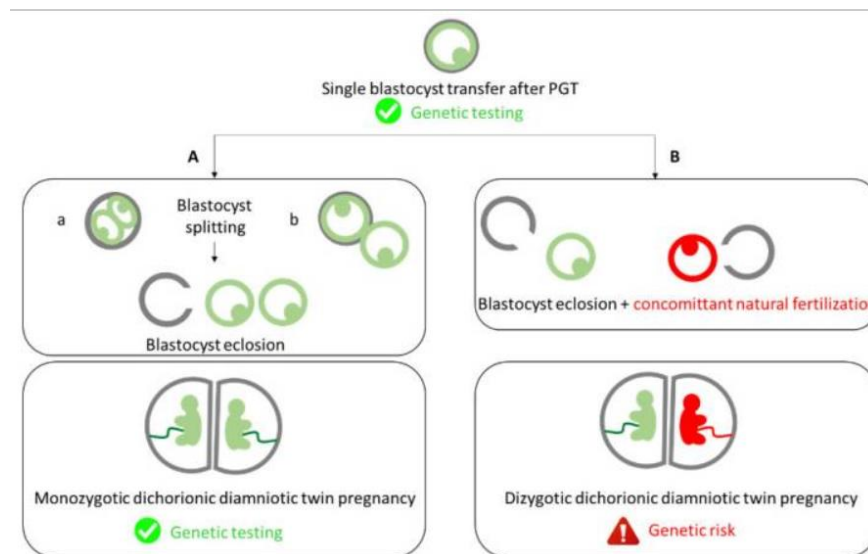


Figura 2:

Representação esquemática dos mecanismos embrionários que podem levar à gravidez gemelar dicoriónica diamniótica (**A**) Divisão do blastocisto (a) antes ou (b) depois da sua transferência levando a uma gravidez gemelar dicoriónica diamniótica monozigótica (**B**) Transferência de blastocisto e gravidez espontânea concomitante. Adaptado de: Brouillet, et al., 2022.

Os gémeos MZT, ao partilharem a mesma placenta, trocam sangue entre si, através de anastomoses, enquanto essa troca for equilibrada, trata-se de um fenómeno fisiológico, mas o seu desequilíbrio pode explicar várias das complicações a que este tipo de gestação está sujeita (Sueters & Oepkes, 2014): Síndrome de transfusão (TTTS), Sequência de perfusão arterial reversa (TRAPS), Sequência de anemia policitemia gemelar (TAPS), morte fetal intrauterina única (Moise, 2014).

As causas do aumento do risco de MZT após TRA permanecem inconclusivas, mas uma revisão identificou a idade materna, a transferência em blastocisto, a cultura prolongada e a estimulação ovárica como potenciais factores de risco (Hviid et al., 2018).

1.2 Processo celular para a formação de monozigóticos

A formação de gémeos MZT envolve a divisão de um único zigoto em dois ou mais embriões geneticamente idênticos. Este fenómeno é complexo envolvendo processos celulares complexos, e a ciência propõe várias teorias para explicar esses mecanismos:

1. “Hipótese da Repulsão Celular”: Esta teoria baseia-se nas células do zigoto em desenvolvimento que possuem diferenças genéticas subtis e geram forças de repulsão entre elas, levando à divisão do zigoto. Essa repulsão pode estar relacionada com variações na expressão genética que desencadeiam o processo de geminação (Hall, 1996; Matorras et al., 2023).
2. “Hipótese dos Eixos Codominantes”: Nesta teoria, um eixo codominante de desenvolvimento do embrião, diferente do eixo dominante usual, pode levar à divisão do embrião. Esse eixo adicional poderia ser responsável por desdobramentos que resultam na formação de gémeos MZT (Matorras et al., 2023).
3. “Níveis de Cálcio”: Outra teoria propõe que níveis baixos de cálcio no embrião inicial podem desencadear a divisão do embrião. O cálcio é crucial para a regulação da adesão celular e para a compactação, processos essenciais no desenvolvimento inicial do embrião (Steinman & Valderrama, 2001; Matorras et al., 2023).
4. “Hérnia de Blastomero”: Esta teoria sugere que uma hérnia de blastomero, onde partes do embrião se projetam anormalmente, pode levar à formação de gémeos MZT. A distorção física resultante pode favorecer a separação celular que resulta na geminação (Matorras et al., 2023).

Além dessas teorias, estudos recentes em TRA como a Time-Lapse Monitoring (TLM) têm explorado os “traços morfocinéticos” do embrião. Esses estudos indicam que a análise detalhada dos tempos de divisão celular e da morfologia do embrião pode fornecer indícios sobre a probabilidade de geminação. Por exemplo, tempos específicos de compactação ou de transição entre estadios celulares têm sido associados a uma maior probabilidade de gestações gemelares. Outro preditor de gemelaridade relatado é a “desagregação da massa celular interna (MCI)”. A incidência de gemelaridade MZT pode ser reduzida evitando a transferência de embriões que contêm MCI soltas, conforme confirmado por observações de lapso de tempo. Os investigadores usaram imagens de lapso de tempo para examinar o grau e a densidade da massa celular interna e a sua relação com o desenvolvimento de gémeos MZT e concluíram que a desagregação da MCI pode ser um dos fatores de risco

que podem predispor à divisão da MCI, o que pode levar à geminação monozigótica (Otsuki et al., 2016).

Esta combinação de teorias e novas tecnologias como o TLM oferece uma visão mais clara dos mecanismos celulares envolvidos na formação de gêmeos MZT, embora ainda muito precisa ser estudado para se compreender totalmente esses processos.

1.3. Objetivos

A gravidez gemelar monozigótica é um acontecimento raro em procriação medicamente assistida (PMA) e pensa-se estar associada à realização de tratamentos de fertilização in vitro (FIV) e/ou práticas laboratoriais. Além disso, alguns estudos sugerem que o desenvolvimento embrionário pode ser influenciado por fatores como a estimulação ovárica, a manipulação dos embriões e os protocolos de transferência, podem contribuir para o aumento deste tipo de gestação. Além disso, a vitrificação de embriões também tem sido associada a um maior risco de gemelaridade monozigótica, tornando este fenômeno um objeto de estudo em reprodução assistida.

Recentemente, na clínica CEMEARE foi reportado seis casos de gravidezes gemelares monocoriônicas, sem uma relação aparente. Deste modo, seria importante investigar melhor as possíveis causas eventualmente presentes relacionadas ou não a procedimentos clínicos ou laboratoriais.

A presente dissertação tem como objetivo a consolidação de conhecimentos por meio de uma investigação bibliográfica em gravidezes gemelares monozigóticas/monocoriônicas, com o auxílio da comparação de dados relativos aos ciclos de fertilização in vitro e/ou injeção intracitoplasmática (ICSI) e/ou transferências de embriões congelados (TECs) realizados na clínica CEMEARE – Centro Médico de Assistência à Reprodução dos quais resultaram as gravidezes gemelares monocoriônicas.

Capítulo II

Gêmeos Monozigóticos

2.1 Estimulação Ovária

Pensa-se que a estimulação ovária possa ter influência na formação de monozigóticos. Medicamentos como gonadotrofinas e citrato de clomifeno podem alterar a estrutura da zona pelúcida (ZP), aumentando a vulnerabilidade do embrião à divisão da massa celular interna (Derom et al., 1987).

Uma análise indicou que uma proporção maior de gêmeos concebidos após estimulação ovária com citrato de clomifeno eram MZT em comparação com casos iatrogênicos em que nenhum citrato de clomifeno foi usado (Catherine Derom et al., 2006). Outro estudo concluiu que a frequência de MZT estava mais associada à estimulação ovária controlada e à indução da ovulação por terapia com gonadotrofinas do que outros procedimentos de TRA, com uma taxa geral de MZT de 0,95% para todos os procedimentos de TRA e uma taxa de 1,5% após a indução da ovulação ou estimulação ovária isolada (Schachter, 2001).

Um grande estudo focou o efeito da estimulação ovária controlada numa análise multivariada indicando que o protocolo de supressão do agonista de GnRH aumentou a taxa de MZT enquanto doses maiores de FSH (≥ 3000 UI) diminuíram a taxa de MZT (Luke et al., 2014). No entanto, em 2018 outro estudo sugere que o uso de gonadotrofinas e o uso de agonista ou antagonista de GnRH não alteraram significativamente a taxa de incidência de gêmeos MZT (Ikemoto et al., 2018) assim como, outro estudo mais recente também sugere que diferentes protocolos de estimulação ovária e a dose total de hCG não tiveram efeito sobre a incidência de gêmeos MZT (Chen et al., 2023).

2.2 Idade Materna

Relatos sugerem que a idade materna mais avançada está associada a gestações MZT. Isto seria explicado pela zona pelúcida mais fina, pois é proposto que a sua espessura média diminui gradualmente com o aumento da idade materna, o que pode alterar o processo normal de eclosão (Luke et al., 2014). No entanto, outros estudos, mostram que gestações MZT acontecem com mais frequência após a fertilização de ovócitos jovens. Embora embriões de ovócitos jovens tenham mais hipóteses de serem transferidos como blastocistos avançados, o aumento na incidência de gêmeos permaneceu significativo, sendo possível especular que a produção de MZT é outra maneira pela qual ovócitos mais

jovens, presumivelmente mais saudáveis, demonstram maior potencial reprodutivo (J. Knopman et al., 2010; Wu et al., 2014; Knopman et al., 2014).

Um estudo sugeriu que pacientes com menos idade e excelente função ovárica, estradiol elevado, elevado número de ovócitos recuperados, baixo consumo de FSH necessário para estimulação de um oócito e alta taxa de implantação, estavam ligados a maior probabilidade de MZT (Sobek et al., 2015).

Na metanálise de Busnelli et al., quatro estudos avaliaram o efeito da idade dos oócitos no risco de MZT, estimando a incidência desse evento entre mulheres com 35 anos ou mais e mulheres mais jovens. O agrupamento dos resultados dos estudos incluídos na metanálise mostrou um aumento estatisticamente significativo do risco entre mulheres com menos de 35 anos (Busnelli et al., 2019). Esposito e os seus colaboradores confirmaram uma associação entre o risco de MZT e a idade jovem: mulheres com menos de 35 anos apresentaram duas vezes mais gestações de MZT do que mulheres com mais de 35 anos (Esposito et al., 2021).

2.3 Fatores Genéticos e Epigenéticos

As tecnologias de reprodução assistida envolvem superovulação, manipulação de embriões, cultura de embriões e transferência de embriões, expondo os gametas e os embriões a um ambiente hormonal alterado com mudanças na temperatura, pH e tensão de oxigênio. Essas exposições ocorrem em momentos críticos do desenvolvimento, que coincidem com a reprogramação global do epigenoma e o estabelecimento de alterações epigenéticas que persistem até a idade adulta (Mani et al., 2020).

Os gêmeos MZT surgem em torno de períodos críticos para a reprogramação epigenética. Uma primeira onda de reprogramação epigenética global ocorre durante a gametogênese (quando os oócitos sofrem desmetilação do DNA) e logo após a fecundação, quando o embrião de pré-implantação sofre múltiplas ondas de desmetilação global do DNA, seguida de remetilação (Zhu et al., 2018).

Um estudo realizou o sequenciamento do genoma completo de quatro gerações consecutivas de sete famílias e identificaram potenciais loci de mutação no cromossoma X com padrão de herança dominante, no entanto, apenas um dos gêmeos estava a passar à próxima geração. A penetrância incompleta do local responsável poderia ser uma explicação. Estes achados fornecem uma nova direção para explicar alguns casos de gemelaridade MZT (S. Liu et al., 2018). Também Soberk A e colaboradores, em 2015 sugeriram que fatores hereditários estavam associados à incidência de gêmeos MZT.

2.4 Laboratório:

2.4.1 Meios de Cultura e Cultura Prolongada

Poucos estudos exploraram como os meios de cultura influenciam a divisão embrionária e a ocorrência de gêmeos MZT. Entre os estudos que investigaram a relação entre o meio de cultura e a gemelaridade, nem Mateizel et al. nem Papanikolaou et al. encontraram uma associação entre o tipo de meio de cultura e a incidência de MZT.

Os componentes dos meios de cultura e as suas concentrações podem desempenhar um papel importante. A longa exposição do embrião a baixos níveis de cálcio pode desestabilizar as ligações intracelulares e, conseqüentemente, predispor a MCI à divisão. Por outro lado, o meio usado para cultivar blastocistos pode levar a uma superestimulação da apoptose através da formação de radicais livres devido aos níveis excessivos de glicose. A polarização linear das células apoptóticas na MCI pode levar à divisão durante ou antes do processo de eclosão. Também os fatores de crescimento podem induzir mudanças na via de sinalização, deslocamento citoplasmático ou alterações de polaridade no embrião, o que pode aumentar o risco de MZT (Busnelli et al., 2019).

A cultura prolongada de embriões e a transferência de blastocistos, em comparação com a transferência de embriões em estadio de clivagem, são fatores significativos que contribuem para uma taxa mais alta de gêmeos MZT durante os procedimentos de TRA (Hviid et al., 2018; (Busnelli et al., 2019).

Foi verificado num modelo humano *in vitro* para gêmeos monocoriônicos que a separação da MCI pode acontecer durante a cavitação através de um processo de fissão da MCI (Luijckx et al., 2024).

A transferência de embriões no estadio de blastocisto (dia 5) também pode estar associada a taxas mais altas de MZT. Para explicar o possível mecanismo pelo qual o cultivo prolongado afeta a taxa de MZT, a maioria das teorias concentra-se no endurecimento da zona pelúcida. Este endurecimento pode comprimir a massa celular interna e induzir a divisão do embrião durante a eclosão. Por outro lado, as transferências de embriões de elevada qualidade, após cultivo prolongado, são mais sensíveis aos efeitos da manipulação mecânica no laboratório ou às mudanças de temperatura e pH durante o manuseamento, o que pode resultar em taxas mais altas de MZT após a transferência de blastocisto (Sobek et al., 2016).

Vários autores mostraram um aumento significativo de MZT após a transferência de blastocistos em comparação com embriões em estadio de clivagem (Luke *et al.*, 2014; Mateizel *et al.*, 2016; Ikemoto *et al.*, 2018; «OUP accepted manuscript», 2020).

2.4.2. Técnicas de micromanipulação

A gemelaridade monozigótica após fertilização *in vitro* (FIV). foi relatada pela primeira vez em 1984 (Yovich *et al.* 1984) e, desde então, vários estudos demonstraram um aumento da ocorrência de gêmeos MZT associados a procedimentos de TRA. Na Europa, 365 103 ciclos de TRA em 2003 indicaram que gestações gemelares e trigêmeas representaram 23% de todos os partos (Andersen *et al.* 2007).

A Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), consiste na injeção direta de um espermatozóide no citoplasma do oócito. Isso permite a fertilização com um número muito reduzido de espermatozoides, incluindo aqueles que estão imóveis. Desde a primeira aplicação bem-sucedida em 1991 (Palermo *et al.* 1992), a ICSI tornou-se um procedimento comum, especialmente em casos de infertilidade masculina.

O hatching assistido (AH), envolve a manipulação da zona pelúcida do embrião usando métodos químicos, mecânicos ou a laser para facilitar a eclosão do embrião e aumentar a probabilidade de implantação (Aston *et al.*, 2008).

O Teste Genético Pré-implantatório (PGT) é uma técnica utilizada na reprodução assistida para identificar alterações genéticas em embriões antes de serem transferidos para o útero. O procedimento é particularmente relevante para casais que têm um risco elevado de transmitir doenças genéticas aos seus filhos. No processo de PGT, células de embriões em estadio de blastocisto são biopsiadas e analisadas. Embriões que não apresentam as anomalias genéticas são selecionados para implantação, o que aumenta as oportunidades de uma gravidez saudável (Harper & SenGupta, 2012).

A ICSI, AH o PGT tem suscitado discussões sobre uma possível ligação entre técnicas de micromanipulação e o aumento de MZT. Para a implantação do embrião na parede uterina, este deve eclodir da zona pelúcida (ZP). A zona pelúcida é uma camada de mucopolissacarídeos e proteínas específicas que envolve o oócito. Essa camada atua como uma barreira biológica que permite a identificação dos espermatozoides humanos e protege o embrião durante os estadios iniciais de divisão. A manipulação mecânica desta zona pode estimular a divisão da massa celular interna. Técnicas como a ICSI, AH e PGT manipulam esta zona de maneiras diferentes, deixando pequenos defeitos na ZP, o que pode complicar

o processo natural de eclosão do embrião. O embrião pode contornar o seu próprio mecanismo de lise da ZP e herniar através desses defeitos, predispondo a MZT (Luke et al., 2014; Sobek et al., 2016; Hviid et al., 2018).

Um estudo de Skiadas em 2008 demonstrou que a micromanipulação envolvendo ICSI ou AH, em conjunto com a transferência no Dia 5, levam a um risco aumentado de placentação monocoriónica, resultando num risco 24 vezes maior desta condição obstétrica. Também Vitthala em 2009, recolheu 27 estudos numa meta-análise e concluiu que casais que passaram por ICSI tiveram uma taxa de MZT mais alta do que casais que passaram por FIV. Afirma ainda que a transferência em blastocisto e a ICSI estão associados a um risco de 4,25 e 2,25 vezes maior de gémeos monozigóticos.

Nos últimos anos houve uma diminuição do uso de AH concomitante à crescente sensibilização de que essa intervenção é ineficaz para a taxa de gravidez (Alteri et al., 2018).

Na metanálise de Busnelli, dez estudos investigaram o possível impacto do método de inseminação (FIV ou ICSI). na taxa de gestações MZT, mostrou um aumento estatisticamente significativo desse risco após o uso de FIV clássica. A hipótese de um mecanismo biológico que explique esta associação é muito difícil. Podemos pensar em preferir FIV na infertilidade não masculina e em pacientes com oócitos de boa qualidade e alto potencial de fertilização?

Hviid e colaboradores com base em mais de 10 estudos de elevada qualidade, concluíram que não há um consenso claro sobre a influência dos métodos de tratamento da fertilidade na frequência de MZT.

Um estudo comparativo entre Mulheres submetidas à transferência de embrião único após PGT envolvendo biópsia embrionária ou fertilização in vitro sem PGT, demonstrou um risco aumentado de divisão monozigótica com biópsia embrionária (Kamath et al., 2020).

Um estudo recente envolvendo TRA, foi observado um caso interessante de MZT num embrião humano com recurso a TLM. Durante o processo de manipulação do oócito, a zona pelúcida sofreu uma rotura, foi realizado ICSI e na primeira divisão celular, um dos dois blastómeros saiu da ZP, enquanto o outro permaneceu dentro. Os dois blastómeros, continuaram a desenvolver-se independentemente em blastocistos, com o potencial de resultar em gémeos monozigóticos dicoriónicos, ou seja, gémeos idênticos com placentas separadas. Ambos os embriões resultantes se desenvolveram normalmente e foram vitrificados. Sugere-se que o orifício na ZP possa facilitar a extrusão de algumas células do embrião <dia 4 e que esse desenvolvimento celular não seja restringido por estar dentro da ZP. A célula totipotente foi capaz de se desenvolver corretamente desde o início e o embrião

dentro da ZP compensou a perda dessa célula aparentemente sem problemas (Matorras et al., 2023).

2.4.3 Transferência de Embriões Congelados

Tem existido uma tendência de diminuição da MZT que pode estar ligada à transferência de embriões congelados, independentemente do estadio de desenvolvimento. A difusão progressiva e generalizada das transferências congeladas é a mudança mais relevante que ocorreu nos últimos 10-15 anos na TRA. Existe associação entre a transferência de embriões congelados e a menor taxa de MZT (Mateizel et al., 2016). Pode-se especular um papel importante no ambiente endometrial na transferência de embriões frescos. Durante a fase de implantação, os embriões transferidos em ciclos a fresco são expostos a um meio não fisiológico e isso pode causar algumas perturbações que acabam por facilitar a gemelaridade monozigótica. Se confirmado, esse aspecto pode ser um ponto adicional a favor de uma estratégia de transferências congeladas (Esposito et al., 2021).

Outro estudo, utilizou dados de 8459 gestações, compreendidas entre 2014 e 2018, resultantes de transferência de embriões únicos para comparar a taxa de MZT entre transferência de embrião (TE) a fresco e TE congelado e demonstrou que a TEC (2,25%) parece estar significativamente associado a uma diminuição da frequência de MZT em comparação com o TE a fresco (3,10%). Os riscos associados à TE a fresco devem ser considerados no aconselhamento de pacientes com infertilidade (X. Liu et al., 2020).

2.5 Complicações dos Gêmeos Monozigóticos

A gravidez gemelar, que resulta de uma combinação de fatores genéticos e ambientais (idade materna, histórico familiar de gestações múltiplas, hábitos, condições sociais), ocorre em cerca de 2-4% dos nascimentos vivos, com taxas mais altas em algumas partes da África. Nos últimos 30 anos, a incidência de gestações gemelares aumentou em mais de 70% globalmente, principalmente devido ao recurso a técnicas de PMA principalmente em países desenvolvidos. Essas gestações estão associadas a complicações obstétricas significativas, incluindo taxas até seis vezes maiores de mortalidade perinatal em comparação com gestações únicas, principalmente devido a partos prematuros e restrições de crescimento fetal. O risco de mortalidade materna também é significativamente maior em gestações gemelares. Estudos recentes destacam a gravidez gemelar como um fator de risco para morbidade e mortalidade materna e perinatal (on behalf of the WHO Multi-Country Survey on Maternal and Newborn Health Research Network et al., 2018).

Gestações gemelares monozigóticas apresentam um risco ainda maior de complicações maternas e fetais do que gestações únicas e dizigóticas. A placentação monocoriônica está associada a riscos adicionais devido à angioarquitetura específica das placentas monocoriônicas, que pode levar à formação de anastomoses feto-fetais, isto é, conexões vasculares entre os sistemas circulatórios dos dois fetos gêmeos que podem ser artério-arteriais ou artério-venosas permitindo a troca de sangue entre os gêmeos. Este fenômeno pode ter consequências significativas para a saúde dos fetos e, portanto, desenvolvimento de condições patológicas como síndrome de transfusão gemelar, sequência de anemia-policitemia gemelar, morte fetal intrauterina única e restrição seletiva do crescimento intrauterino (Busnelli et al., 2019). A gemelaridade monozigótica acarreta maior risco de distúrbios da perfusão placentária, acidentes do cordão umbilical e anomalias do desenvolvimento (Sobek et al., 2015).

Um estudo com o objetivo de determinar o efeito das propriedades coriônicas da gravidez gemelar nas complicações da gravidez e nos resultados fetais concluiu que a incidência de complicações maternas, como hipertensão induzida pela gravidez, diabetes mellitus gestacional, polidrâmnio, ruptura prematura de membranas e descolamento prematuro da placenta e hemorragia pós-parto grave, no grupo MCDA e no DCDA não foi significativamente diferente. No entanto, a taxa de perda fetal no grupo MCDA foi 6 vezes maior do que no DCDA, e a taxa de mortalidade perinatal foi 2 vezes maior. Da mesma

forma, as taxas de perda fetal e mortalidade perinatal no grupo MCDA foram 4 vezes (17,7% vs. 4,4%) e 1,7 vezes (4,6% vs. 2,8%) maiores do que as do grupo DCDA ($P < 0,05$). Esses resultados implicam que gêmeos monocoriônicos têm um risco maior de resultados piores do que gêmeos dicoriônicos, sugerindo que os resultados adversos fetais estão correlacionados com propriedades coriônicas (Feng et al., 2018).

As gestações de gêmeos monocoriônicos monoamnióticos (MCMA) são raras e associadas a taxas aumentadas de complicações quando comparadas com gestações únicas, dicoriônicas e monocoriônicas diamnióticas em geral. A falta de uma membrana intergêmeos resulta em problemas como enrolamento do cordão umbilical, tornando o diagnóstico e a gestão dessas gestações desafiadores. A identificação da síndrome de transfusão feto-fetal (TTTS) é mais complexa nessas gestações, especialmente sem uma diferença visível no volume de líquido amniótico e sem a membrana separadora dos gêmeos. O rastreamento precoce da anatomia fetal ajuda na detecção inicial de anomalias estruturais, da sequência de perfusão arterial invertida do gêmeo (TRAP) e de gêmeos siameses. Embora o acompanhamento precoce possa reduzir o risco de morte fetal, não há um consenso sobre as melhores práticas para vigilância e momento do parto. Geralmente, é recomendado um parto prematuro por cesariana por volta de 33 semanas para minimizar riscos. As práticas atuais são principalmente baseadas em opiniões de especialistas devido à falta de evidências claras (Khairudin & Khalil, 2022).

Capítulo III

CEMEARE

No âmbito do Mestrado em Embriologia e Reprodução Humana na Universidade Lusófona, foi proposto um estágio curricular numa clínica de Procriação Medicamente Assistida que foi realizado no Centro Médico de Assistência à Reprodução (CEMEARE). Uma clínica existente desde 1999, constituída por uma equipa multidisciplinar que se dedica aos casais com alterações de fertilidade. Para esta dissertação, foram facultados alguns dados da clínica, referentes a 2023, para análise.

3.1. Materiais

No ano de 2023, foram realizadas 403 transferências de embriões congelados, das quais 157 resultaram em gravidez. Dessas, 6 foram gravidez gemelar monocoriónica, com apenas um saco amniótico, sendo que de 4 nasceram 2 nados vivos, as outras 2 apenas 1 (Tabela 2). Os dados recolhidos das 6 gravidezes por considerações éticas e de proteção de dados foram anonimizados e organizados (Tabela 1).

	Data da Punção	Estimulação	Idade Mulher na fertilização	Técnica	Data da Transf.	Técnica Transf.	Idade da Mulher na Transferência
1	04/11/2022	Curto antagonistas	40	ICSI	02/01/2023	TEC	40
2	03/08/2022	Curto combo antagonistas	33	ICSI-DO	31/03/2023	TEC	42
3	23/03/2023	Curto antagonistas	28	ICSI	14/04/2023	TEC	28
4	28/11/2022	Curto antagonistas	33	ICSI	17/04/2023	TEC	33
5	23/05/2023	Curto combo antagonistas	33	ICSI-DO	05/07/2023	TEC	35
6	10/08/2022	Curto antagonistas	32	FIV	24/11/2023	TEC	33

Tabela 1: Dados recolhidos da CEMEARE das 6 gravidezes gemelares monocoriónica.

	Gravidez			Parto			
	Data bHCG	bHCG	Nº de sacos	Semanas	Tipo	NV	Sexo
1	14/01/2023	1897	1	33	Cesariana	2	M
2	12/04/2023	657,3	1	34	Cesariana	2	F
3	26/04/2023	700,9	1	34	Cesariana	2	M
4	26/04/2023	139,5	1	36	Cesariana	1	F
5	17/07/2023	587	1	26	Cesariana	1	F
6	06/12/2023	571	1	33	Cesariana	2	M

Tabela 2: Dados recolhidos da CEMEARE referentes à confirmação das gravidezes gemelares monocoriónicas e aos nascimentos.

3.2 Discussão

A presente dissertação tinha inicialmente como objetivo comparar os dados recolhidos da clínica CEMEARE e investigar possíveis causas relacionadas com procedimentos clínicos e/ou laboratoriais que podem dar origem a gravidezes gemelares monocoriônicas. Contudo, os dados obtidos não permitiram realizar uma análise estatística, pois a amostra é muito reduzida e não tem significado estatístico.

Os seis casos relatados tiveram uma estimulação com antagonistas, apenas num deles foi realizado FIV enquanto nos outros 5 a técnica utilizada foi ICSI. Duas ICSI foram realizadas com oócitos de dadora, ambas com 33 anos. Foi realizada cultura prolongada, sendo que os meios utilizados foram os mesmos, mas com lotes diferentes, os embriões foram criopreservados em estadio de blastocisto que foram transferidos uns meses mais tarde (Tabela 1).

Em estudos anteriores, Busnelli e a sua equipa, na metanálise realizada verificou uma taxa mais alta de MZT não só após transferência do blastocisto quando comparado com o estadio de clivagem, mas também em mulheres com menos de 35 anos. Nesta análise, 5 das 6 mulheres encontram-se abaixo dos 35 anos no momento da fertilização (Tabela 1; casos 2 a 6) mas todas fizeram a transferência no estadio de blastocisto. A transferência de embriões de qualidade está descrita como um fator de risco levantando a hipótese destes embriões poderem ser mais sensíveis a mudanças de temperatura e pH durante a cultura. Este aspeto seria interessante estudar pois nos nossos resultados, temos dois casos que aconteceram na mesma semana (Tabela 1; caso 3 e 4). Terá sido algo no ambiente do laboratório? Manipulação pelo mesmo embriologista? Alguma mudança nessa semana? Pipetas, caixas, lotes de meios? Calibração da incubadora? Coincidência? Existe um elevado número de variáveis e por isso é difícil haver uma associação. Também é suposto que mulheres mais férteis ou reprodutivamente mais eficientes, tenham mais embriões de boa qualidade, logo, mais embriões em blastocisto congelados. Seria interessante perceber quantos embriões excedentes congelados têm as mulheres mais jovens, principalmente as de dadoras.

Estudos recentes têm-se concentrado na transferência de embriões congelados como sendo um fator de risco de MZT. Teoricamente, um rompimento ou endurecimento da zona pelúcida ou uma mudança dentro do embrião durante o processo de congelamento/descongelamento poderiam explicar a gemelaridade, também alguma variação na expressão de genes associados à morfologia embrionária pode ter influência no

estabelecimento de MZT (Vaughan et al., 2020). No entanto, contrariamente a isto, vários autores concluem que existe associação entre a transferência de embriões congelados e a menor taxa de MZT (Mateizel et al., 2016; X. Liu et al., 2020; Esposito et al., 2021).

Segundo a revisão bibliográfica realizada, era esperado que os casos fossem todos provenientes de ICSI, pois é onde existe mais manipulação mecânica da zona pelúcida podendo estimular a divisão da massa celular interna, porém, nesta análise, existe um caso em que a técnica utilizada foi FIV, sendo difícil explicar a sua associação (Tabela 1; caso 6).

A maioria das publicações sobre MZT procura explicar as causas deste fenómeno para se poder explicar ou tentar evitá-lo, mas também é importante estudar os desfechos clínicos. Um estudo de coorte, avaliou o resultado clínico de gestações gemelares concebidas com recurso a reprodução assistida e mostrou um risco aumentado de parto prematuro, menos peso ao nascer e morte neonatal comparando gravidezes MC com DC. A mortalidade é maior em todas as idades gestacionais com uma taxa de mortalidade intrauterina oito vezes maior após 32 semanas de gestação (Hack et al., 2008). Mesmo na ausência de síndrome da transfusão feto-fetal (TTTS) ou a morte de um dos fetos, gémeos monocoriónicos, especialmente os prematuros, têm maior risco de problemas neurológicos quando comparados a gémeos dicoriónicos. Isso ocorre porque as múltiplas anastomoses vasculares entre os gémeos MC podem causar desequilíbrios temporários no sistema cardiovascular que podem ser suficientes para reduzir o fluxo sanguíneo para o cérebro, resultando em lesões cerebrais (Gratacós et al., 2004). Nesta análise, todos os partos foram realizados até às 36 semanas. Curiosamente, os casos de morte neonatal são opostos. Um corresponde ao tempo de gestação mais longo (36 semanas) o que vai de encontro ao descrito, mas o outro corresponde ao tempo de gestação mais curto (26 semanas), tendo sido um parto muito prematuro e muito provavelmente com muitas complicações obstétricas. (Tabela 2, caso 4 e 5)

Os dados fornecidos para esta análise, são insuficientes para uma comparação mais aprofundada. Seria necessário comparar o que foi feito nas gravidezes únicas para perceber onde pode haver diferença e o que pode estar a causar as gravidezes gemelares. As variáveis são imensas e seria necessário um estudo mais cuidado e aprofundado dos procedimentos e materiais utilizados durante o período analisado.

Capítulo IV

Conclusão

A geminação monozigótica é um fenómeno complexo influenciado por uma combinação de fatores biológicos e, possivelmente, ambientais. Embora a divisão do zigoto seja o ponto de partida, o momento dessa divisão e as condições ao redor do desenvolvimento embrionário desempenham papéis cruciais na determinação dos tipos e riscos associados a gestações MZT. Estas gestações são mais comuns após técnicas de reprodução assistida do que naturais, contudo não existem consenso sobre as causas exatas do seu aumento. Devido às complicações associadas a estas gestações, é crucial o aconselhamento adequado dos pacientes e o exame precoce da corionicidade durante a gestação.

Nem todos os gémeos monozigóticos são monocoriónicos. Se a divisão do embrião ocorre nos primeiros dias após a fertilização, cada gémeo pode desenvolver uma placenta separada (dicoriónica) mas, se a divisão ocorre mais tarde, os gémeos podem partilhar a mesma placenta (monocoriónica) e/ou o mesmo saco amniótico (monoamniótico). No entanto, todos os gémeos monocoriónicos são monozigóticos, pois resultam de um único óvulo.

Estudos anteriores indicaram que o risco de MZT pode ser aumentado por vários fatores, incluindo cultura de blastocisto, HA, ciclo congelado, fertilização in vitro convencional, idade materna na recuperação do oócito e biópsia de embrião, mas os estudos foram heterogêneos, uma forte associação em um estudo pode ser fraca ou vaga em outro (Xu et al., 2021). Isto torna extremamente difícil chegar a alguma conclusão sobre como evitar a monozigotia. São inúmeras variáveis a ter em conta e a rastreabilidade é difícil. Para o desenvolvimento futuro, foi sugerido por Sutherland et al (2019), incluir a análise da divisão da MCI na classificação de blastocistos. Isso ajudaria a evitar a transferência de embriões que já apresentam sinais de divisão, priorizando embriões com MCI intacta e, assim, diminuindo o risco de MZT. As alterações na apoptose de embriões em desenvolvimento devido a diferenças laboratoriais também podem ser uma explicação, o que seria interessante fazer o rastreamento das taxas de MZT como uma medida de controlo de qualidade (Vaughan et al., 2020).

Referências Bibliográficas

- Alteri, A., Viganò, P., Maizar, A. A., Jovine, L., Giacomini, E., & Rubino, P. (2018). Revisiting embryo assisted hatching approaches: a systematic review of the current protocols. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(3), 367–391. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1118-4>
- Andersen, A. N., Goossens, V., Gianaroli, L., Felberbaum, R., de Mouzon, J., & Nygren, K. G. (2007). Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(6), 1513–1525. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem053>
- Aston, K. I., Peterson, C. M., & Carrell, D. T. (2008). Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. *Reproduction*, 136(4), 377–386. <https://doi.org/10.1530/rep-08-0206>
- Behr, B., & Milki, A. A. (2003). Visualization of atypical hatching of a human blastocyst in vitro forming two identical embryos. *Fertility and Sterility*, 80(6), 1502–1503. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.07.001>
- Blickstein, I., Verhoeven, H. C., & Keith, L. G. (1999). Zygotic splitting after assisted reproduction. *The New England Journal of Medicine*, 340(9), 738–739. <https://doi.org/10.1056/nejm199903043400916>
- Brouillet, S., Mereuze, S., Ranisavljevic, N., Chauveau, C., Hamamah, S., Cattin, J., Verebi, C., Cabrol, C., Ishmukhametova, A., Girardet, A., Anahory, T., & Willems, M. (2022). Molecular characterization of a rare case of monozygotic dichorionic diamniotic twin pregnancy after single blastocyst transfer in preimplantation genetic testing (PGT). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10835. <https://doi.org/10.3390/ijms231810835>
- Busnelli, A., Dallagiovanna, C., Reschini, M., Paffoni, A., Fedele, L., & Somigliana, E. (2019). Risk factors for monozygotic twinning after in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 111(2), 302–317. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.10.025>

Chen, N., Li, J., Li, Y., Zhang, Y., Li, J., Gao, J., Hu, J., Cui, L., & Chen, Z.-J. (2023). Risk factors associated with monozygotic twinning in offspring conceived by assisted reproductive technology. *Human Reproduction Open*, 2023(4). <https://doi.org/10.1093/hropen/hoad035>

Corner, G. W. (1955). The observed embryology of human single-ovum twins and other multiple births. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 70(5), 933–951. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(55\)90001-6](https://doi.org/10.1016/0002-9378(55)90001-6)

Couck, I., Van Nylen, L., Deprest, J., & Lewi, L. (2020). Monochorionic twins after *in-vitro* fertilization: do they have poorer outcomes? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 56(6), 831–836. <https://doi.org/10.1002/uog.21973>

Derom, C., Derom, R., Vlietinck, R., Berghe, H. V., & Thiery, M. (1987). Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction. *Lancet*, 329(8544), 1236–1238. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)92688-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)92688-2)

Derom, Catherine, Leroy, F., Vlietinck, R., Fryns, J.-P., & Derom, R. (2006). High frequency of iatrogenic monozygotic twins with administration of clomiphene citrate and a change in chorionicity. *Fertility and Sterility*, 85(3), 755–757. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.034>

Esposito, G., Somigliana, E., Franchi, M., Dallagiovanna, C., Pisaturo, V., Corrao, G., & Parazzini, F. (2021). Trend of medically induced monozygotic twin deliveries according to age, parity, and type of assisted reproductive technique during the period 2007–2017 in Lombardy Region, Northern Italy: a population-based study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(9), 2341–2347. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02268-0>

Feng, B., Zhai, J., & Cai, Y. (2018). Effect of twin pregnancy chorionic properties on maternal and fetal outcomes. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 57(3), 351–354. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.03.002>

Gratacós, E., Carreras, E., Becker, J., Lewi, L., Enríquez, G., Perapoch, J., Higuera, T., Cabero, L., & Deprest, J. (2004). Prevalence of neurological damage in monochorionic twins with selective intrauterine growth restriction and intermittent absent or reversed end-diastolic umbilical artery flow: Brain damage in twins. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The*

Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 24(2), 159–163. <https://doi.org/10.1002/uog.1105>

Hack, K. E. A., Derks, J. B., Elias, S. G., Franx, A., Roos, E. J., Voerman, S. K., Bode, C. L., Koopman-Esseboom, C., & Visser, G. H. A. (2008). Increased perinatal mortality and morbidity in monochorionic versus dichorionic twin pregnancies: clinical implications of a large Dutch cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 115(1), 58–67. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2007.01556.x>

Hall, J. G. (1996). Twins and twinning. *American Journal of Medical Genetics*, 61(3), 202–204. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19960122\)61:3<202::aid-ajmg2>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19960122)61:3<202::aid-ajmg2>3.0.co;2-w)

Harper, J. C., & SenGupta, S. B. (2012). Preimplantation genetic diagnosis: State of the ART 2011. *Human Genetics*, 131(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1056-z>

Hviid, K. V. R., Malchau, S. S., Pinborg, A., & Nielsen, H. S. (2018). Determinants of monozygotic twinning in ART: a systematic review and a meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 24(4), 468–483. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy006>

Ikemoto, Y., Kuroda, K., Ochiai, A., Yamashita, S., Ikuma, S., Nojiri, S., Itakura, A., & Takeda, S. (2018). Prevalence and risk factors of zygotic splitting after 937 848 single embryo transfer cycles. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 33(11), 1984–1991. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey294>

Jin, H., Han, Y., & Zenker, J. (2024). Cellular mechanisms of monozygotic twinning: clues from assisted reproduction. *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmae022>

Kamath, M. S., Antonisamy, B., & Sunkara, S. K. (2020). Zygotic splitting following embryo biopsy: a cohort study of 207 697 single-embryo transfers following IVF treatment. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 127(5), 562–569. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16045>

Khairudin, D., & Khalil, A. (2022). Monochorionic monoamniotic twin pregnancies. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 84, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2022.08.004>

Knopman, J., Krey, L. C., Lee, J., Fino, M. E., Novetsky, A. P., & Noyes, N. (2010). Monozygotic twinning: an eight-year experience at a large IVF center. *Fertility and Sterility*, 94(2), 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.064>

Knopman, J. M., Krey, L. C., Oh, C., Lee, J., McCaffrey, C., & Noyes, N. (2014). What makes them split? Identifying risk factors that lead to monozygotic twins after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 102(1), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.03.039>

Konno, H., Murakoshi, T., Miura, K., & Masuzaki, H. (2020). The incidence of dichorionic diamniotic twin pregnancy after single blastocyst embryo transfer and zygosity: 8 years of single-center experience. *Twin Research and Human Genetics: The Official Journal of the International Society for Twin Studies*, 23(1), 51–54. <https://doi.org/10.1017/thg.2020.5>

Kyono, K. (2013). The precise timing of embryo splitting for monozygotic dichorionic diamniotic twins: When does embryo splitting for monozygotic dichorionic diamniotic twins occur? Evidence for splitting at the Morula/blastocyst stage from studies of in vitro fertilization. *Twin Research and Human Genetics: The Official Journal of the International Society for Twin Studies*, 16(4), 827–832. <https://doi.org/10.1017/thg.2013.32>

Lin, J., Zhang, K., Wu, F., Wang, B., Chai, W., Zhu, Q., Huang, J., & Lin, J. (2024). Maternal and perinatal risks for monozygotic twins conceived following frozen-thawed embryo transfer: a retrospective cohort study. *Journal of Ovarian Research*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01349-9>

Liu, H., Liu, J., Chen, S., Kang, X., Du, H., & Li, L. (2018). Elevated incidence of monozygotic twinning is associated with extended embryo culture, but not with zona manipulation or freeze-thaw procedure. *Fertility and Sterility*, 109(6), 1044–1050. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.040>

Liu, Shiqi, Hong, Y., Cui, K., Guan, J., Han, L., Chen, W., Xu, Z., Gong, K., Ou, Y., Zeng, C., Li, S., Zhang, D., & Hu, D. (2018). Four-generation pedigree of monozygotic female twins reveals genetic factors in twinning process by whole-genome sequencing. *Twin Research and Human Genetics: The Official Journal of the International Society for Twin Studies*, 21(5), 361–368. <https://doi.org/10.1017/thg.2018.41>

- Liu, Shuhua, Xu, Q., Qian, J., Liu, D., Zhang, B., Chen, X., & Zheng, M. (2024). Pregnancy outcomes of monochorionic diamniotic and dichorionic diamniotic twin pregnancies conceived by assisted reproductive technology and conceived naturally: a study based on chorionic comparison. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12884-024-06521-z>
- Liu, X., Li, P., & Shi, J. (2020). Double trouble? Impact of frozen embryo transfer on the monozygotic twinning rate: a retrospective cohort study from 8459 cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(12), 3051–3056. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01985-2>
- Luijckx, D. G., Ak, A., Guo, G., van Blitterswijk, C. A., Giselsbrecht, S., & Vrij, E. J. (2024). Monochorionic twinning in bioengineered human embryo models. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 36(25). <https://doi.org/10.1002/adma.202313306>
- Luke, B., Brown, M. B., Wantman, E., & Stern, J. E. (2014). Factors associated with monozygosity in assisted reproductive technology pregnancies and the risk of recurrence using linked cycles. *Fertility and Sterility*, 101(3), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.034>
- Mani, S., Ghosh, J., Coutifaris, C., Sapienza, C., & Mainigi, M. (2020). Epigenetic changes and assisted reproductive technologies. *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society*, 15(1–2), 12–25. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1646572>
- Mateizel, I., Santos-Ribeiro, S., Done, E., Van Landuyt, L., Van de Velde, H., Tournaye, H., & Verheyen, G. (2016). Do ARTs affect the incidence of monozygotic twinning? *Human Reproduction (Oxford, England)*, 31(11), 2435–2441. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew216>
- Matorras, R., Vendrell, A., Ferrando, M., & Larreategui, Z. (2023). Early spontaneous twinning recorded by time-lapse. *Twin Research and Human Genetics: The Official Journal of the International Society for Twin Studies*, 26(3), 215–218. <https://doi.org/10.1017/thg.2023.24>
- Moise, K., Jr. (2014). Surveillance of monochorionic twins. *American Journal of Perinatology*, 31(S 01), S3–S6. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1382256>

on behalf of the WHO Multi-Country Survey on Maternal and Newborn Health Research Network, Santana, D. S., Silveira, C., Costa, M. L., Souza, R. T., Surita, F. G., Souza, J. P., Mazhar, S. B., Jayaratne, K., Qureshi, Z., Sousa, M. H., Vogel, J. P., & Cecatti, J. G. (2018). Perinatal outcomes in twin pregnancies complicated by maternal morbidity: evidence from the WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12884-018-2082-9>

Otsuki, J., Iwasaki, T., Katada, Y., Sato, H., Furuhashi, K., Tsuji, Y., Matsumoto, Y., & Shiotani, M. (2016). Grade and looseness of the inner cell mass may lead to the development of monochorionic diamniotic twins. *Fertility and Sterility*, 106(3), 640–644. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.05.007>

OUP accepted manuscript. (2020). *Human reproduction open*. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa024>

Palermo, G. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340(8810), 17–18. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92425-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92425-f)

Papanikolaou, E. G., Human Fatemi, Venetis, C., Donoso, P., Kolibianakis, E., Tournaye, H., Tarlatzis, B., & Devroey, P. (2010). Monozygotic twinning is not increased after single blastocyst transfer compared with single cleavage-stage embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 93(2), 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.088>

Schachter, M. (2001). Monozygotic twinning after assisted reproductive techniques: a phenomenon independent of micromanipulation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(6), 1264–1269. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.6.1264>

Semrl, N., Barth, M., Feigl, S., Hochstätter, R., Oreskovic, I., Fluhr, H., Klaritsch, P., Speicher, I., & Kollmann, M. (2023). Birth of monozygotic dichorionic twins after a single blastocyst embryo transfer: a case report of genetic determination of zygosity. *F&S Reports*, 4(2), 231–234. <https://doi.org/10.1016/j.xfre.2023.03.002>

Shi, W., Jin, L., Liu, J., Zhang, C., Mi, Y., Shi, J., Wang, H., & Liang, X. (2021). Blastocyst morphology is associated with the incidence of monozygotic twinning in assisted reproductive technology. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 225(6), 654.e1-654.e16. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.06.101>

- Skiadas, C. C., Missmer, S. A., Benson, C. B., Gee, R. E., & Racowsky, C. (2008). Risk factors associated with pregnancies containing a monochorionic pair following assisted reproductive technologies. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 23(6), 1366–1371. <https://doi.org/10.1093/humrep/den045>
- Sobek, Aleš, Jr, Zbořilová, B., Procházka, M., Šilhánová, E., Koutná, O., Klásková, E., Tkadlec, E., & Sobek, A. (2015). High incidence of monozygotic twinning after assisted reproduction is related to genetic information, but not to assisted reproduction technology itself. *Fertility and Sterility*, 103(3), 756–760. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.12.098>
- Sobek, Ales, Prochazka, M., Klaskova, E., Lubusky, M., & Pilka, R. (2016). High incidence of monozygotic twinning in infertility treatment. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 160(3), 358–362. <https://doi.org/10.5507/bp.2016.016>
- Steinman, G., & Valderrama, E. (2001). Mecanismos de geminação. III. Placentação, redução de cálcio e compactação modificada. *O Jornal de medicina reprodutiva*, 46(11), 995–1002.
- Sueters, M., & Oepkes, D. (2014). Diagnosis of twin-to-twin transfusion syndrome, selective fetal growth restriction, twin anaemia-polycythaemia sequence, and twin reversed arterial perfusion sequence. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 28(2), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2013.12.002>
- Van Langendonckt, A., Wyns, C., Godin, P. A., Toussaint-Demyille, D., & Donnez, J. (2000). Atypical hatching of a human blastocyst leading to monozygotic twinning: a case report. *Fertility and Sterility*, 74(5), 1047–1050. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)01554-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)01554-5)
- Vaughan, D. A., Seidler, E. A., Murphy, L. A., Cleary, E. G., Penzias, A., Norwitz, E. R., & Sakkas, D. (2020). Double trouble? Clinic-specific risk factors for monozygotic twinning. *Fertility and Sterility*, 114(3), 587–594. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.04.010>
- Vitthala, S., Gelbaya, T. A., Brison, D. R., Fitzgerald, C. T., & Nardo, L. G. (2009). The risk of monozygotic twins after assisted reproductive technology: a systematic review and meta-

- analysis. *Human Reproduction Update*, 15(1), 45–55.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmn045>
- Wohlmuth, C., Gardiner, H. M., Diehl, W., & Hecher, K. (2016). Fetal cardiovascular hemodynamics in twin–twin transfusion syndrome. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 95(6), 664–671. <https://doi.org/10.1111/aogs.12871>
- Wu, D., Huang, S.-Y., Wu, H.-M., Chen, C.-K., Soong, Y.-K., & Huang, H.-Y. (2014). Monozygotic twinning after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment is not related to advanced maternal age, intracytoplasmic sperm injection, assisted hatching, or blastocyst transfer. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 53(3), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2014.07.001>
- Xu, S., Zheng, Q., Mo, M., Xiong, F., Hu, X., & Zeng, Y. (2021). High grade trophoctoderm is associated with monozygotic twinning in frozen-thawed single blastocyst transfer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05928-1>
- Yovich, J. L., Stanger, J. D., Graaug, A., Barter, R. A., Lunay, G., Dawkins, R. L., & Mulcahy, M. T. (1984). Monozygotic twins from in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 41(6), 833–837. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)47894-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)47894-5)
- Zhu, P., Guo, H., Ren, Y., Hou, Y., Dong, J., Li, R., Lian, Y., Fan, X., Hu, B., Gao, Y., Wang, X., Wei, Y., Liu, P., Yan, J., Ren, X., Yuan, P., Yuan, Y., Yan, Z., Wen, L., ... Tang, F. (2018). Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nature Genetics*, 50(1), 12–19. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0007-6>