



HOSPITAL ESPAÑOL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

Facultad de Medicina



HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO
DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

IMPACTO DEL USO DE ASSISTED HATCHING EN LAS TECNICAS DE
REPRODUCCION ASISTIDA DE ALTA COMPLEJIDAD EN LA CLINICA
HISPAREP (HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO) DEL PERIODO 01 ENERO 2008
A 30 JUNIO 2015

TESIS

Para Obtener El Grado De Especialidad en Rama de:
Biología de la Reproducción Humana

Presenta:

DRA. MILDRED IBETH FLORES CORTÉS

RESIDENTE

Investigador responsable:

Dr. Sergio Téllez Velasco

México, DF Julio de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCION	5
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	10
DISCUSION	12
CONCLUSIONES	14
BIBLIOGRAFIA	15

IMPACTO DEL USO DE ASSISTED HATCHING EN LAS TECNICAS DE
REPRODUCCION ASISTIDA DE ALTA COMPLEJIDAD EN LA CLÍNICA
HISPAREP (HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO) DE PERIODO ENERO 2008 A
JUNIO 2015

Introducción: la eclosión asistida del blastocisto (assisted hatching) es un procedimiento que se realiza con la finalidad de realizar un pequeño orificio para adelgazar o perforar la zona pelúcida del embrión antes de ser transferido a la cavidad uterina. Se realiza inmediatamente antes de realizar la transferencia y existen distintas técnicas para realizarlo, por ejemplo usando solución acida de Tyrode, enzimas proteolíticas, perforación con laser o con microaguja de vidrio. El posible beneficio de esta técnica es que el embrión logre aumentar las posibilidades de implantación a la cavidad uterina.

Objetivo: Analizar la utilidad clínica del uso de Assisted Hatching en los resultados de reproducción asistida de fecundación in vitro en la clínica de fertilidad HISPAREP del Hospital español de enero de 2008 a junio de 2015.

Material y métodos:

Se realizo un estudio de cohorte retrospectiva de mujeres sometidas a ciclos de fertilización in vitro en la clínica de reproducción asistida del Hospital Español del periodo de 1 enero de 2008 a 30 junio de 2015.

De esta manera se dividió a la pacientes en mujeres a las que se les realizo ciclo de fecundación in vitro y se transfirieron embriones sin Assisted Hatching (grupo control) y las pacientes a las que se les realizo ciclo de fecundación in vitro con transferencia de embriones sometidos a Assisted Hatching (Grupo AH).

Resultados:

Se estudiaron un total de 95 pacientes a las cuales se les transfirieron embriones con Assisted Hatching (grupo AH) , y 1500 pacientes a las que se les transfirieron embriones sin AH (grupo control)

En nuestro estudio HISPAREP 2015, se observó una edad media en el grupo control de 36.7 años vs. 38.1 años en el grupo AH, tasa de implantación de 13.5% en el grupo AH y de 11.85% en el grupo control, tasa de embarazo clínico de 36.9% en el grupo control vs 48.05% en el grupo con AH, tasa de embarazo a termino de 38.6 % en el grupo control vs 21.1 % en el grupo AH y tasa de embarazo en curso de 7.5 % en el grupo control vs. 1.8 % en el grupo AH.

Por lo tanto se observo una mejoría en los resultados en pacientes a las que se les realizó AH en tasa de implantación, tasa de embarazo a termino.

Conclusiones: los estudios e investigaciones actuales no recomiendan el uso de assisted hatching de manera rutinaria, sin embargo debe ser utilizado en paciente con pronóstico pobre, incluyendo aquellos en los que ha fallado 2 o mas ciclos, en pacientes con embriones de mala calidad y en mujeres mayores de 38 años.

Introducción

A pesar de numerosos avances en los programas de fecundación in vitro y las técnicas de ICSI, la tasa de implantación de embriones aptos para ser transferidos sigue siendo baja, se ha estimado que hasta el 85% de los embriones transferidos no llegue a implantarse [1]. Se ha observado que la tasa de implantación en programas de FIV / ICSI es de 10% a 15% para el día 2 o 3 de desarrollo, y 23% a 25% para las transferencias de blastocisto. La capacidad de un embrión para su adecuado desarrollo e implantación, se debe principalmente a la calidad de los gametos procedentes y las características intrínsecas del embrión, tales como su constitución cromosómica y la calidad del citoplasma [2]. Sin embargo, algunas proporciones de embriones euploides con potencial de desarrollo completo no logran implantar debido a dificultades para lograr incubar [2]. Se han propuesto y practicado numerosos enfoques para mejorar la tasa de implantación. Estos incluyen [1] mejorar la técnica de transferencia de embriones, [3] la mejora de la receptividad del endometrio, y [4] la mejora de la capacidad de la implantación del embrión.

La eclosión asistida (AH) se ha propuesto como un método para mejorar la capacidad de los embriones para implantar. Este proceso implica la interrupción artificial de la zona pelúcida.

Se ha empleado una numerosa variedad de técnicas incluyendo adelgazamiento de la zona, perforación y la eliminación completa de la misma; el uso de químicos, otras técnicas mecánicas, y el uso de láser [5].

En la última década, el AH se ha ofrecido a los pacientes de mayor edad, así como a aquellos con falla recurrente de implantación.

La eclosión asistida fue descrita por primera vez por Cohen et al. que reportó el primer embarazo posterior a este procedimiento en 1988 [6]. Este trabajo pionero fue seguido por numerosas publicaciones. Algunas de estas publicaciones reportaron un aumento significativo en la tasa de embarazo y / o implantación en todos los pacientes [7]; otras publicaciones reportaron una mejoría significativa en los pacientes con un mal pronóstico, es decir, las mujeres mayores de 38 años de edad, los embriones con zona pelúcida gruesa, y los pacientes con falla repetida de implantación [8-10]; mientras que un tercer grupo de publicaciones informó una mejoría no significativa en la tasa de embarazo en pacientes con mal pronóstico [7, 11-14]. Por el contrario, algunas publicaciones informaron de ninguna mejora en el embarazo o la implantación [15-17]. Motivo por el cual se estudiaron los resultados en la clínica de reproducción asistida del hospital Español HISAREP durante el período 01 de enero 2008 a 30 Junio 2015.

La estructura y función de la zona pelúcida

El ovocito humano y el embrión temprano está rodeado de una matriz acelular con un espesor de 13- 15 micras denominada “zona pelúcida” [22], que está compuesta por glicoproteínas, carbohidratos y proteínas “Zona pelúcida específicas”. La zona pelúcida esta constituida por dos capas, la externa que es gruesa, mientras que la interior es delgada pero resistente [3]. Esta es de gran importancia estructural y funcional durante la fertilización y el desarrollo de preimplantación del embrión. Está implicada en la unión de los espermatozoides, sobretodo en la inducción de la reacción acrosómica [17]. Después de la fertilización, la zona pelúcida bloquea la poliespermia e impide la dispersión de las blastómeras, ayuda en el transporte por el oviducto y evita el contacto con otras células [18]. Es esencial para

mantener la integridad del embrión previamente compactado. La compactación es la formación de las uniones estructurales entre las blastómeras. Una vez que se produce la compactación, la zona pelúcida ya no es esencial [19].

Proceso de eclosión

Al llegar a la etapa de blastocisto, una combinación de lisinas "proteasas producidas por el embrión escindido (trofoectodermo)" realizan la lisis de la zona pelúcida. [20-22].

Por otra parte, la expansión física de la masa embrionaria reduce el espesor de la zona de modo que las células del trofoectodermo interactúan con las células del endometrio y la implantación se produce. Es un proceso, mediante el cual el blastocisto expandido experimenta ciclos de contracciones y expansiones hasta que se vuelve casi invisible [23]. La elasticidad y adelgazamiento de la zona pelúcida son fundamentales para el éxito de la eclosión, que es un requisito previo para la implantación [24].

Justificación

Los embriones pueden tener una zona pelúcida gruesa intrínsecamente ($> 15 \mu\text{m}$), o un endurecimiento secundario de la zona pelúcida producido durante el cultivo in vitro y/o después de la criopreservación [25].

La relación entre el espesor de la zona pelúcida y la capacidad de implantación ha sido estudiada, sugiriendo que el factor limitante para la eclosión exitosa, no es el espesor en general, sino la resistencia de la capa interior. Como resultado, la eliminación química de la parte exterior de la zona pelúcida del embrión de Día 3 no tiene impacto en la tasa de implantación, mientras que la creación de un agujero en la zona pelúcida puede mejorar la implantación del embrión [11]. La

justificación para la realización de procedimiento de eclosión asistida puede ser para superar una deficiencia en la producción de una lisina embrionaria intrínseca que promueve la eclosión después de la expansión del blastocisto [25]. Se ha demostrado que algunos embriones pueden experimentar una reducción o incluso una completa incapacidad para secretar el "factor de eclosión", lo que puede inhibir la eclosión normal. En esta situación, el adelgazamiento artificial, o la apertura de la zona pelúcida en una etapa de desarrollo anterior podría aumentar la incidencia de la eclosión.

Mecanismo de AH

Aunque el mecanismo por el cual la eclosión asistida promueve la implantación del embrión sigue siendo poco clara, hay explicaciones posibles. La ventana de implantación es el período crítico cuando el endometrio alcanza su estado receptivo ideal para la implantación. Lo que sugiere que una sincronización precisa entre el embrión y el endometrio es esencial [26].

La implantación temprana se ha asociado con el embarazo viable posterior, mientras que los implantes diferidos, se ha asociado con una alta incidencia de aborto [27]. Los embriones con lagunas artificiales en sus zona pelúcida inician eclosión antes que los embriones con zona pelúcida intacta [28]. Por lo tanto, se puede postular que la eclosión asistida facilita la implantación permitiendo contacto adecuado del embrión con endometrio. Además, aunque la mayoría de las moléculas son capaces de atravesar la zona pelúcida, la tasa de transporte puede estar relacionada con el espesor de la zona. Un transporte bidireccional de los metabolitos y los factores de crecimiento a través de la zona pelúcida puede ser alterada debido a la presencia de la brecha artificial [11, 29]. Dicho contacto

puede permitir la exposición anterior de los embriones a los factores de crecimiento vitales. Para que el mecanismo de la mejora de AH, los datos experimentales en el modelo de ratón ha demostrado incrementar la formación de blastocisto del embrión (en días 5) en un grupo tramado (en el día 3) en comparación con el control, teóricamente, el AH abre importantes vías para transportar los nutrientes de los medios de comunicación están incubando. Estos nutrientes mejoran el desarrollo del embrión y la formación de blastocisto [30].

Material y métodos:

Se realizó un estudio de cohorte retrospectiva de mujeres sometidas a ciclos de fertilización in vitro en la clínica de reproducción asistida del Hospital Español del periodo de 1 enero de 2008 a 30 junio de 2015. Se determinó la variable demográfica edad materna, así como variables de laboratorio como HCG positiva o negativa, y variables de desenlace como tasa de implantación, tasa de aborto y tasa de embarazo logrado a término, así como tasa de embarazo aun en curso.

De esta manera se dividió a las pacientes en mujeres a las que se les realizó ciclo de fecundación in vitro y se transfirieron embriones sin Assisted Hatching (grupo control) y las pacientes a las que se les realizó ciclo de fecundación in vitro con transferencia de embriones sometidos a Assisted Hatching. Con revisión de los expedientes, se obtuvieron variables clínicas y de laboratorios con fines de comparación entre ambos grupos.

Se determinaron medias y desviación estándar para las variables numéricas y se estimaron las tasas para comparar los valores de desenlace entre ambos grupos y

así estimar la importancia clínica de realizar dicho procedimiento previo a la transferencia de embriones.

En la clínica de HISPAREP se utiliza el assisted hatching con un diodo laser de 1480 nm, el software ha sido diseñado para lograr un posicionamiento fácil , así como para facilitar el enfocar y la medición de los embriones , el laser cuenta con tres intensidades de energía, baja de 35 mW, media 45 mW y alta de 55 mW, que pueden ser liberados por un simple disparo de 25 milisegundos con un clic en el mouse controlador, la potencia baja es usada para perforar zonas muy delgadas (<10um) o minimizar la exposición, la media es para perforar la zona de la mayoría de los embriones y la alta intensidad se utiliza para perforar zona pelúcida gruesa (>15um) o una zona pelúcida muy resistente.

Las indicaciones para realizar assisted hatching en nuestra clínica son: falla repetida de la implantación (dos ciclos de FIV, ICSI o transferencia de embriones vitrificados, con transferencia de al menos 4 embriones en blastómeras o 2 blastocistos de buena calidad), zona pelúcida gruesa, edad > de 35 años y baja calidad embrionaria

Resultados:

Se estudiaron un total de 95 pacientes a las cuales se les transfirieron embriones con Assisted Hatching (grupo AH) , y 1500 pacientes a las que se les transfirieron embriones sin AH (grupo control)

En nuestro estudio HISPAREP 2015, se observo una edad media en el grupo control de 36.7 años vs. 38.1 años en el grupo AH, tasa de implantación de 13.5%

en el grupo AH y de 11.85% en el grupo control, tasa de embarazo clínico de 36.9% en el grupo control vs 48.05% en el grupo con AH, tasa de embarazo a termino de 38.6 % en el grupo control vs 21.1 % en el grupo AH y tasa de embarazo en curso de 7.5 % en el grupo control vs. 1.8 % en el grupo AH.

Por lo tanto se observo una mejoría en los resultados en pacientes a las que se

Se compararon varios estudios Cohen et al en 1992 estudiaron 68 pacientes en grupo control vs 69 pacientes en grupo AH refiere mejoría en la tasa de implantación en pacientes con AH, así como en tasa de embarazo clínico y de embarazo a termino.

Hellebaut et al (1996) estudiaron 60 pacientes en grupo control vs 60 pacientes en grupo AH refiere mínima mejoría en la tasa de implantación en pacientes con AH, así como mejoría notable en tasa de embarazo clínico y de embarazo a termino.

(30)

Hurst et al (1998) estudiaron 7 pacientes en grupo control vs 13 pacientes en grupo AH y en este caso es notable una disminución en la tasa de implantación en pacientes con AH, así como en tasa de embarazo clínico y de embarazo a termino. (31)

Lazendorf et al (1998) (8) estudiaron 52 pacientes en grupo control vs 42 pacientes en grupo AH y en este caso es equivalente la tasa de implantación en pacientes con AH vs el grupo control, sin embargo se observo una disminución en la tasa de embarazo clínico y de embarazo a termino. (8)

Mansour et al (2000) estudiaron 25 pacientes en grupo control vs 27 pacientes en grupo AH y en este caso se observa un aumento en la tasa de implantación en pacientes con AH vs el grupo control, así como un aumento en la tasa de embarazo clínico y de embarazo a término en dichas pacientes. (15)

Discusión

La eclosión del blastocisto es un paso crítico en la secuencia de los eventos fisiológicos que culminan con la implantación. La falta de eclosión [debido a las anomalías intrínsecas, ya sea en el blastocisto o zona pelúcida (ZP)] puede ser uno de muchos factores que limitan la eficiencia reproductiva humana.

La eclosión asistida implica el adelgazamiento artificial de la ZP y se ha propuesto como una técnica para mejorar las tasas de implantación y embarazo después de la fertilización in vitro (FIV). Sugiere una mejora en las tasas de implantación cuando el procedimiento se aplica de manera selectiva a los embriones con un "mal pronóstico" basado en el espesor de la zona pelúcida, número de blastómeros, el porcentaje de fragmentación, la edad materna, etc.) (2).

El procedimiento de incubación asistida se realiza generalmente en día 3 después de la fertilización utilizando diversos métodos. Estos incluyen la creación de una abertura en la zona ya sea mediante la perforación con una solución acidificada de Tyrode (3, 4), con una microaguja de vidrio (5), fotoablación láser (6), o el uso de un piezo micromanipuladora (7) .

El procedimiento de eclosión asistida puede estar asociada con complicaciones específicas independientes del procedimiento de FIV en sí, incluyendo daño letal para el embrión y el daño a blastómeros individuales con reducción de la viabilidad

del embrión. Además, la manipulación artificial de la ZP se ha asociado con un mayor riesgo de hermanamiento monocigótico (10, 11). Los pacientes cuyos embriones son incubados a menudo son tratados con antibióticos y esteroides antes y después de la transferencia de embriones, exponiéndolos a los posibles riesgos y efectos secundarios de estos tratamientos.

Las tasas de éxito después del uso de la incubación asistida en los programas de terapia de reproducción asistida han variado considerablemente. Sin embargo, las diferencias en las poblaciones de pacientes, la experiencia del operador, la técnica de la eclosión y el diseño del estudio hacen que sea difícil comparar los resultados directamente desde diferentes centros. Una revisión completa y meta-análisis (12, 13) identificaron 23 ensayos controlados aleatorizados con 2572 mujeres sometidas a incubación asistida durante técnicas de reproducción asistida. Las tasas de embarazo clínico se evaluaron en 19 ensayos (722 embarazos clínicos, 2175 mujeres) y demostraron una mejoría después de la eclosión asistida (OR 1,63; IC del 95%: 01.27 a 02.09), pero con heterogeneidad significativa. Los subgrupos de pacientes que demostraron la mayor mejora en las tasas de embarazo clínico fueron aquellos con ciclos de técnicas de reproducción asistida fallidas anteriores (OR 2,33; IC del 95% 1.63- 3.34) y las mujeres de mayor edad.

En general, las tasas de nacidos vivos en los dos grupos no eran diferentes, aunque las distintas poblaciones de estudio fueron heterogéneas (OR 1,26; IC del 95%: 0,82 a 1,78). Suponiendo una tasa de ejecución del 30% en el grupo de control general, se necesitaría un total de 720 pacientes para detectar una diferencia del 10% en las tasas de parto entre los dos grupos ($P < 0,05$). Los

números de nacimientos vivos descritos en los estudios hasta el momento por lo tanto, no permiten una conclusión confianza con respecto a la eficacia clínica de los procedimientos de incubación asistida.

Conclusiones: los estudios e investigaciones actuales no recomiendan el uso de assisted hatching de manera rutinaria, sin embargo debe ser utilizado en pacientes con pronóstico pobre, incluyendo aquellos en los que presentan falla repetida de la implantación, en pacientes con embriones de mala calidad o con zona pelúcida muy gruesa y en mujeres mayores de 38 años, ya que se ha comprobado que en estas pacientes si tiene una mejoría significativa en la tasa de embarazo clínico, en la tasa de implantación y en la tasa de embarazo a termino.

Bibliografía

1. Cohen J. Assisted hatching of human embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1991;8:179-90.
2. Liu HC, Cohen J, Alikani M, Noyes N, Rosenwaks Z. Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril* 1993;60:871-5.
3. Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992;7:685-91.
4. Khalifa EA, Tucker MJ, Hunt PP, Hamidi J. Improved hatching in mouse embryos brought about by combined partial zona dissection and co-culture. *Hum Reprod* 1993; 8:599-603.
5. Chao KH, Chen SU, Chen HF, Wu MY, Yang YS, Ho HN. Assisted hatching increases the implantation and pregnancy rate of in vitro fertilization (IVF)-embryo transfer (ET), but not that of IVF-tubal ET in patients with repeated IVF failures. *Fertil Steril* 1997;67:904-8.
6. Mahadevan MM, Miller MM, Maris MO, Moutos D. Assisted hatching of embryos by micromanipulation for human in vitro fertilization: UAMS experience. *J Ark Med Soc* 1998 ;94:529-31.
7. Bider D, Livshits A, Yonish M, Yemini Z, Mashiach S, Dor J. Assisted hatching by zona drilling of human embryos in women of advanced age. *Hum Reprod* 1997; 12:317-20.
8. Lanzendorf SE, Nehchiri F, Mayer JF, Oehninger S, Muasher SJ. A prospective, randomized, double-blind study for the evaluation of assisted hatching in patients with advanced maternal age. *Hum Reprod* 1998;13:409- 13.

9. Edirisinghe WR, Ahnonkitpanit V, Promviengchai S, Suwajanakorn S, Pruksananonda K, Chinpilas V, Virutamasen P. A study failing to determine significant benefits from assisted hatching: patients selected for advanced age, zonal thickness of embryos, and previous failed attempts. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:294-301.
10. Strohmer H, Feichtinger W. Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1992;58:212-4.
11. Obruca A, Strohmer H, Sakkas D, Menezo Y, Kogosowski A, Barak Y, Feichtinger W. Use of lasers in assisted fertilization and hatching. *Hum Reprod* 1994;9: 1723-6.
12. Dokras A, Ross C, Gosden B, Sargent IL, Barlow DH. Micromanipulation of human embryos to assist hatching. *Fertil Steril* 1994;61:514-20.
13. Khalifa EA, Tucker MJ, Hunt P. Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992;7:532-
14. Blake DA, Forsberg AS, Johansson BR, Wikland M. Laser zona pellucida thinning-an alternative approach to assisted hatching. *Hum Reprod* 2001;16:1959-64. 36.
15. Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacretaz G, Fakan S. Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48-microns diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. *Fertil Steril* 1995;64:604-11.

16. Douglas-Hamilton DH, Conia J. Thermal effects in laser- assisted pre-embryo zona drilling. *J Biomed Opt* 2001; 6:205-13.
17. Horng SG, Wang HS, Wang ML, Huang HY, Lee CL, Tsai CC, Wang CW, Huang YH, Soong YK. The role of the oocyte and the sperm in the outcome after intracytoplas- mic sperm injection (ICSI). *J Reprod Infertil* 1998;7:157- 63.
18. Veeck LL. Oocyte assessment and biological performance in IVF. *N Y Acad Sci* 1988;541:259-74.
19. Cohen J, Williadsen S, Schimmel T, Levron J. Micromanipulation as a clinical tool. In: Trouson AO, Gardner DK. *Handbook of in vitro fertilization*. 2nd ed. CRC press 1999:265-306.
20. Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, Wiemer K. Impairment of the hatching process of following IVF in the human and improvement of implan- tation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990;5:7-13.
21. Cohen J, Feldberg D. Effects of the size and number of zona pellucida openings on hatching and trophoblast out- growth in the mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 1991;30:70-22. Dokras A, Ross C, Gosden B, Sargent IL, Barlow DH. Micromanipulation of human embryos to assist hatching. *Fertil Steril* 1994;61:514-2
22. Khalifa EA, Tucker MJ, Hunt P. Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blas- tocyt hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992;7:532

23. Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacretaz G, Pedrazzini T, Hornung JP. Improved fertilization and implantation rates after non-touch zona pellucida micro- drilling of mouse oocytes with a 1.48 micron diode laser beam. *Hum Reprod* 1996;11:1043-8.

24. Mantoudis E, Podsiadly BT, Gorgy A, Venkat G, Craft IL A comparison between quarter, partial and total laser assisted hatching in selected infertility patients. *Hum Reprod* 2001;16:2182-6.

25. Hsu MI, Barroso G, Mayer J, Lanzendorf S, Gibbons WE, Muasher S, Oehninger S. Is the timing of implantation affected by zona pellucida micromanipulation? *J Assist Reprod Genet* 2000;17:34-8.

26. O'Neill C. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for 28. Tucker MJ, Luecke NM, Wiker SR, Wright G. Chemical removal of the outside of the zona pellucida by day 3 human embryos has no impact on implantation rate. *J Assist Reprod Genet* 1993;10:187-91.

27. Hurst BS, Tucker KE, Awoniyi A, Schlaff WD. Assisted hatching does not enhance IVF success in good-prognosis patients. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:62-4.

28. Hellebaut S, De Sutter P, Dozortsev D, Onghena A, Qian C, Dhont M. Does assisted hatching improve implantation rates after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in all patients? A prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:19-22.

29. Mansour RT, Rhodes CA, Aboulghar MA, Serour GI, Kamal A. Transfer of zona-free embryos improves outcome in poor prognosis patients: a prospective randomized controlled study. *Hum Reprod* 2000;15: 1061–4.