



Impacto de la eclosión asistida con láser (técnica en cuartos) en pacientes con pobre pronóstico reproductivo

RESUMEN

Antecedentes: las bajas tasas de implantación representan el mayor obstáculo a vencer para mejorar la eficacia de las técnicas de reproducción asistida. Los principales factores asociados con la implantación son: calidad embrionaria, receptividad endometrial y transferencia de embriones. La técnica de la eclosión asistida se ha propuesto para incrementar las tasas de implantación en pacientes con pobre pronóstico reproductivo.

Objetivo: valorar el efecto de la eclosión asistida con láser (técnica en cuartos) en pacientes con pobre pronóstico reproductivo.

Materiales y métodos: estudio clínico controlado, prospectivo y con asignación al azar al que se incluyeron pacientes con pobre pronóstico reproductivo: mujeres de \pm 38 años de edad, con concentraciones de FSH basal ≥ 12.0 mUI/mL, con dos o más ciclos fallidos de FIV-ICSI. El grupo de estudio lo conformaron mujeres a quienes se les realizó eclosión asistida a todos los embriones y al grupo control no se le efectuó ninguna técnica de reproducción asistida.

Resultados: se registraron 303 ciclos: 154 del grupo de estudio y 149 del control. Las tasas de embarazo (40.1 vs 19.7%) e implantación (17.5 vs 8.3%) fueron significativamente mayores en el grupo de estudio. No se encontraron diferencias significativas en las tasas de embarazo múltiple (13.11 vs 10%) y aborto (14.7 vs 17.2).

Conclusión: las pacientes con pobre pronóstico reproductivo se benefician con la técnica de eclosión asistida por láser (técnica en cuartos) porque se incrementa la posibilidad de implantación y gestación de los embriones transferidos.

Palabras clave: eclosión asistida, láser, fertilización *in vitro*, ICSI.

Impact of laser-assisted hatching (quarter technique) in poor prognosis patients

ABSTRACT

Background: Poor implantation rates continue to be the determinant factor for results in assisted reproductive techniques; many factors are thought to be involved including embryo quality, endometrial receptivity and embryo transfer. Assisted hatching has been proposed as a technique to improve implantation rates in selected groups of patients, especially with poor prognosis.

Claudia González-Ortega¹
Patricia Cancino-Villarreal¹
Francisco Javier Anaya-Torres¹
Efraín Pérez-Peña²
Antonio M Gutiérrez-Gutiérrez¹

¹ Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida.
León, Guanajuato.

² Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida.
Guadalajara, Jalisco.

Recibido: abril 2015

Aceptado: septiembre 2015

Correspondencia

QCB Claudia González Ortega
Plaza las Américas 115
37160 Guadalajara, Jalisco
gonclau7@yahoo.com.mx

Este artículo debe citarse como:

González-Ortega C, Cancino-Villarreal P, Anaya-Torres FJ, Pérez-Peña E, Gutiérrez-Gutiérrez AM. Impacto de la eclosión asistida con láser (técnica en cuartos) en pacientes con pobre pronóstico reproductivo. Ginecol Obstet Mex 2015;83:670-679.



Objective: To evaluate the impact of the laser assisted hatching performed with quarter technique in patients with poor prognosis.

Material and methods: Prospective, controlled and randomized clinical study. The study group included patients with poor prognosis: maternal age ≥ 38 years, basal FSH ≥ 12.0 mUI/mL, two or more previous FIV/ICSI failures. The control group don't received neither assisted reproductive techniques.

Results: We registered 303 cycles: n=154 in study group (laser assisted hatching) and n=149 in control group. Clinical pregnancy (40.1 vs 19.7%) and implantation (17.5 vs 8.3%) rates were significant higher in laser assisted hatching group, there were not significant differences between multiple pregnancy (13.11 vs 10%) and miscarriage (14.7 vs 17.2) rates.

Conclusion: Laser assisted hatching with quarter technique improves pregnancy and implantation rates in poor prognosis patients.

Key words: Assisted hatching, laser, *in vitro* fertilization, ICSI.

ANTECEDENTES

Las bajas tasas de implantación representan el último obstáculo a vencer para mejorar la eficacia de las técnicas de reproducción asistida. La mala calidad embrionaria y deficiente receptividad endometrial son las principales causas de baja implantación en humanos, incluida la capacidad limitada de los blastocitos para eclosionar la zona pelúcida, lo que repercute negativamente en el proceso. Las situaciones que interfieren con la eclosión espontánea son: edad avanzada,^{1,2} elevadas concentraciones de FSH y diagnóstico de infertilidad,³ el ambiente hormonal alterado durante la estimulación ovárica^{3,4} o las condiciones artificiales del cultivo *in vitro*⁵⁻⁷ (inducen el endurecimiento o grosor anormal de la zona pelúcida), criopreservación ovular y embrionaria, y la utilización de óvulos madurados *in vitro*.⁸

La zona pelúcida es una matriz acelular compuesta por glucoproteínas sulfatadas, con diferentes funciones durante la fertilización y el

desarrollo embrionario. Permite la entrada de un solo espermatozoide para fertilizar al ovocito y bloquea el ingreso de múltiples espermatozoides. Después de la fertilización la zona pelúcida contiene y da forma al embrión, facilita su tránsito a través de la trompa de Falopio hasta la cavidad endometrial y lo protege de microorganismos y células del sistema inmunitario. Es indispensable que el embrión en estadio de blastocisto se libere espontáneamente de esta capa protectora para realizar adecuadamente el proceso de implantación; sin embargo, en algunas situaciones no sucede y requiere efectuarse de manera artificial.

La rotura o adelgazamiento artificial de la zona pelúcida se conoce como eclosión asistida (*assisted hatching*). Es una técnica utilizada desde 1988, por Cohen y su grupo,⁹ para facilitar la salida del embrión de la zona pelúcida y permitir el contacto más temprano con el endometrio. El mecanismo de eclosión asistida para estimular la implantación embrionaria aún se desconoce, pero se sabe que está relacionado con la implantación anticipada en humanos.¹⁰ Se ha

demonstrado que el tiempo de implantación ocurre 1-2 días antes en mujeres con estimulación ovárica con gonadotropinas exógenas comparadas con mujeres con ciclos naturales.¹¹ La aplicación clínica de la eclosión asistida se ha propuesto como estrategia para incrementar las tasas de implantación y embarazo después de la fertilización *in vitro*. Cohen y sus colaboradores fueron los primeros en reportar el incremento en el porcentaje de implantación después de la disección parcial de la zona pelúcida en embriones procedentes de fertilización *in vitro*. Esos investigadores sugirieron que la técnica facilita la eclosión del embrión¹² y la desarrollaron en 1990.¹³ Posteriormente, publicaron un estudio prospectivo, con asignación al azar, con embriones en el día 3 del desarrollo y seleccionaron los de pobre pronóstico (zona pelúcida densa, bajo número de blastómeros y alto grado de fragmentación) e indicaciones para realizar esta técnica. Los resultados mostraron mayor porcentaje de implantación después de la eclosión asistida.¹⁴

La eclosión asistida, como herramienta para incrementar las tasas de implantación, se efectúa el día de la transferencia, casi siempre entre el día 2 y 3 del desarrollo embrionario. Este procedimiento consiste en adelgazar la zona pelúcida¹⁴⁻¹⁶ haciéndole un orificio o eliminándola por completo.¹⁴

Entre las diferentes técnicas de eclosión asistida se incluyen: disección parcial de la zona pelúcida (zona *drilling*), adelgazamiento de la zona con solución ácida de Tyrode, técnica con láser y la utilización de un piezo-eléctrico¹⁶ (dispositivo que penetra y reduce la zona pelúcida mecánicamente mediante un movimiento vibratorio de una aguja producido por pulsos eléctricos; la velocidad e intensidad de los pulsos se regulan con un controlador y el movimiento de la aguja no es lineal, sino circular en un mismo plano, con lo que logra perforar y adelgazar la zona pelúcida).

Las técnicas mecánicas y químicas para adelgazar o abrir artificialmente la zona pelúcida generan mínimos efectos adversos en los embriones.¹⁷ La principal ventaja del láser es que disminuye esos efectos: se ha comprobado que produce un mínimo efecto térmico sin dañar las células, y permite realizar orificios de manera rápida, eficiente, precisa y libre de sustancias químicas.¹⁸

Diversos estudios han evaluado los efectos del láser en embriones humanos y en modelos animales, sin provocar efectos adversos en los desarrollados *in vitro*, lo que representa una técnica segura.¹⁸⁻²³

En los últimos años se ha incrementado, en las unidades de reproducción asistida, la utilización del láser diodo infrarrojo de no contacto (1.48 µm) para la eclosión asistida, en lugar de métodos físicos o químicos debido a sus ventajas, pues permite gran precisión en la ablación de la zona pelúcida, sin necesidad de provocar algún contacto físico o mecánico. La emisión del rayo se realiza a través del objetivo del microscopio, con mínima absorción por la caja y el medio de cultivo, para evitar el pico de absorción ultravioleta del ADN y generar efectos mutagénicos en el embrión. Esta técnica ha desplazado a la eclosión asistida con solución ácida de Tyrode, porque provoca un efecto embriotóxico.²⁴ Además, la utilización del láser es simple y con alta consistencia entre diferentes operadores, aunque requiere de equipo más complejo y adiestramiento especial.

Los estudios que evalúan la efectividad de los diferentes métodos de eclosión asistida son escasos. Balaban y su grupo compararon cuatro diferentes técnicas: 1) eclosión asistida por adelgazamiento de la zona pelúcida con pronasa, 2) disección parcial de la zona pelúcida, 3) aplicación de ácido de Tyrode y 4) uso del láser; y no encontraron diferencias en las tasas



de implantación ni de gestación (estudio no aleatorio).²⁵ Los trabajos aleatorios que comparan estas técnicas con la formación del blastocisto eclosionado *in vitro* y la subsecuente tasa de implantación son escasos.

Aun en los centros donde se realiza la eclosión asistida con láser puede haber diferencias en las tasas de gestación e implantación, según el tipo de ablación que practiquen en la zona pelúcida. Mantoudis y su grupo propusieron tres modalidades de ablación: 1) eclosión total, 2) eclosión parcial y 3) eclosión en cuartos, y encontraron que esta última modalidad genera tasas de gestación y embarazo en evolución más altas; por lo tanto, sugieren que la ablación de la zona pelúcida en su capa más interna puede ir en detrimento con la implantación del embrión.²⁶ Existe consenso de inefectividad del uso rutinario de esta herramienta cuando no se tiene alguna indicación específica para realizarla.²⁷

El objetivo de este estudio es valorar el efecto de la eclosión asistida con láser mediante la técnica en cuartos en pacientes con pobre pronóstico reproductivo (edad materna avanzada mayor de 38 años, concentraciones elevadas de FSH basal >12.0 mUI/mL, más de dos ciclos de implantación FIV-ICSI fallidos).

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio controlado, prospectivo y con asignación al azar efectuado en el Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida, León, Guanajuato, México, entre enero de 2008 y junio de 2010.

De acuerdo con la definición de pobre pronóstico reproductivo (cualquier paciente con alguno o más de los criterios) se incluyeron pacientes iguales o mayores de 38 años de edad, con concentraciones de FSH basal ≥ 12.0 mUI/mL, dos o más ciclos fallidos de FIV-ICSI con transferencia de 6 o más embriones de buena calidad, con re-

ceptividad endometrial adecuada y transferencia embrionaria no traumática.

Con previa autorización del Comité de Ética del Instituto Vida se solicitó el consentimiento de las pacientes para participar en el estudio. Se les explicaron la técnica y las probables ventajas del procedimiento. El grupo de estudio y el control se asignaron al azar conforme ingresaron al programa de FIV-ICSI.

Los criterios de exclusión fueron: pacientes con embriones procedentes de ovodonación o criopreservados, mujeres con menos de 2 folículos, embriones de mala calidad, endometrio no receptivo o con transferencia embrionaria traumática.

Estimulación ovárica y punción folicular

Para el protocolo de estimulación ovárica se administraron 300 UI/día, por vía subcutánea, de FSH recombinante (Gonal-f®) en el segundo día del ciclo menstrual. Todos los ciclos se realizaron con un protocolo flexible de antagonistas de GnRH (Cetrotide®), con aplicación diaria por vía subcutánea cuando dos folículos alcanzaran 14 mm de diámetro. Se efectuaron ultrasonidos vaginales para monitorizar el desarrollo folicular. El pico de ovulación con hGC recombinante (Ovidrelle®) se consideró al detectar, al menos, 1 folículo de 20 mm de diámetro; 37 horas después se efectuó la aspiración mediante punción transvaginal guiada por ultrasonido.

Inseminación y cultivo embrionario

La preparación del semen, identificación y cultivo de ovocitos y embriones se realizó de acuerdo con los protocolos pre establecidos para fertilización *in vitro* e ICSI. Después de su obtención, los ovocitos se lavaron en HTF con Hepes (LifeGlobal®), se cultivaron en micrótotas de 20 µL de Global for Fertilization (LifeGlobal®)

suplementado con HSA al 5% (LifeGlobal®), cubiertas con parafina líquida; posteriormente se inseminaron con 200,000 espermatozoides móviles progresivos por mL o microinyectados, según la técnica publicada.^{28,29} Los ovocitos inseminados se evaluaron a las 17 y 20 horas, para observar la formación de pronúcleos y confirmar su adecuada fertilización. Los cigotos resultantes se cultivaron en microgotas de 20 µL de LifeGlobal® suplementado con HSA al 5%. Se evaluó la morfología embrionaria según su número de blastómeros, regularidad, grado de fragmentación, y mononucleación, multinucleación, o ambas.

Procedimiento de la eclosión asistida

Una vez seleccionados los embriones para su transferencia, mínimo 1 hora antes, se realizó la eclosión asistida con un láser OCTAX diodo de 1.48 µm adaptado a un microscopio invertido Olympus®. La muestra con los embriones se colocó en la placa térmica del microscopio invertido y se posicionó el objetivo del láser, tratando de establecer como sitio diana la parte del embrión donde los blastómeros se encontraran más alejados de la zona pelúcida a tratar, con la finalidad de evitar dañarlos. El grosor de la zona pelúcida se midió en 3 diferentes puntos y se obtuvo su promedio (Figura 1). Se realizó la ablación de la zona pelúcida mediante la técnica de cuartos; el láser se activó con una duración del pulso de 3.6 milisegundos, y se realizaron 6 a 7 disparos por embrión. Se registró el grosor inicial y final de la zona pelúcida e intentó adelgazarla de 7 a 8 µm, hasta adelgazar una cuarta parte (Figura 2). Después de la eclosión asistida se incubaron nuevamente los embriones hasta el momento de su transferencia.

Transferencia embrionaria

La transferencia de embriones se efectuó entre el día 2 y 3. Se seleccionaron los embriones de



Figura 1. Embrión sin eclosión asistida.



Figura 2. Embrión con eclosión asistida.

mejor calidad para transferencia, según el número y regularidad de los blastómeros y la cantidad de fragmentos extracelulares. La técnica se llevó a cabo con guía ultrasonográfica, con un catéter de Frydman® Ultrasoft. Las pacientes permane-



cieron en reposo durante 1 hora después de la transferencia embrionaria.

Soporte de la fase lútea

Se administró progesterona (50 mg al día por vía intramuscular) a partir del día 1, durante 8 y 10 semanas, a menos que la fracción beta-hGC resultara negativa. La determinación de la fracción beta-hGC se efectuó 14 días después de la transferencia de embriones. El diagnóstico de embarazo clínico se estableció con la detección del latido cardíaco fetal por ultrasonido, después de 6 a 7 semanas de la transferencia.

Análisis estadístico

Se utilizó t de Student y χ^2 . El valor <0.05 se consideró con significación estadística.

RESULTADOS

Se registraron 303 ciclos, de los que 154 correspondieron al grupo de estudio (eclosión asistida con láser mediante la técnica en cuartos, en todos los embriones transferidos) y 149 ciclos al grupo control (no se realizó eclosión asistida en ninguno de los embriones transferidos).

No hubo diferencias entre los grupos en: edad de las pacientes, número de intentos previos de fertilización *in vitro*, concentración de FSH basal y porcentaje de pacientes a quienes se practicó ICSI como técnica de inseminación. El diagnóstico de ingreso al programa de reproducción asistida fue similar en ambos grupos. Estos hallazgos sugieren grupos de estudio y control equilibrados, adecuados para la valoración de la técnica a estudiar (Cuadro 1).

No se encontraron diferencias en el número de ovocitos recuperados en ambos grupos, pero se observaron similares tasas de fertilización, degeneración ovocitaria y división embrionaria.

Cuadro 1. Características clínicas de las pacientes

Variable	Grupo de estudio	Grupo control	p
Edad	38.5±2.8	37.3±4.2	ns
Número de intentos	1.8±1.4	1.4±1.2	ns
FSH basal	14.2±6.2	13.4±5.2	ns
Pacientes con ICSI (%)	81	72	
<i>Diagnóstico (%)</i>			
Factor masculino	44.3	36.4	ns
Factor tubárico	24.3	25.0	ns
Inexplicable	22.0	21.5	ns
Endometriosis	30	34	ns
Baja reserva ovárica	25	25	ns
Otros	5.2	5.6	ns

ns: no significativo.

Aunque se encontró un grosor ligeramente aumentado de la zona pelúcida en las pacientes del grupo de estudio, al compararlas con el grupo control (15.5 ± 2.4 vs $14.2 \pm 3.1 \mu\text{m}$, respectivamente) no existió diferencia estadísticamente significativa.

En ninguno de los casos del grupo control se realizó eclosión asistida, aun cuando sus ovocitos tuvieran zona pelúcida gruesa. Ningún caso de eclosión asistida con láser mostró daño visible de los blastómeros ni del embrión. Se transfirieron 2.5 ± 1.1 embriones por paciente en el grupo de estudio y 2.6 ± 1.2 en el control. La tasa de embarazo clínico por transferencia embrionaria fue significativamente mayor en el grupo de estudio (40.1 vs 19.7%, respectivamente), con una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$). La tasa de implantación también fue mayor en el grupo de estudio (17.5%) que en el control (8.3%), con un valor de $p<0.05$.

La tasa de multigestación fue similar en ambos grupos (13.11 vs 10% en el grupo de estudio y control) y todos los embarazos múltiples identificados fueron gemelares (8 vs 3 en el grupo de estudio y control). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aborto: 14.7 vs 17.2%, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de la técnica de reproducción asistida

	Grupo de estudio	Grupo control	p
Número de ciclos	154	149	
Número de transferencias	152	147	
Grosor inicial de la zona pelúcida	15.5±2.4 µm	14.2±3.1 µm	ns
Ovocitos recuperados	6.52±4.9	7.3±4.4	ns
Tasa de fertilización	80.1±12	82.2±13	ns
Tasa de degeneración	3.5%	3.3%	ns
Tasa de división	90.1%	91.2%	ns
Media de embriones transferidos	2.5±1.1	2.6±1.2	ns
Embarazo clínico-ciclo	(61/154) 39.6%	(29/149) 19.4%	p<0.0001
Embarazo clínico-transferencia	(61/152) 40.1%	(29/147) 19.7%	p<0.0001
Implantación	(69/394) 17.5%	(32/385) 8.3%	p<0.0001
Embarazo múltiple	(8/61) 13.11%	(3/29) 10.3%	ns
Aborto	(9/61) 14.7%	(5/29) 17.2%	ns

ns: no significativo.

DISCUSIÓN

Existen resultados contradictorios acerca de las ventajas de la eclosión asistida para mejorar las tasas de implantación y embarazo. Algunos autores apoyan sus ventajas en mujeres de edad avanzada^{17,30-31} y con falla repetida de la implantación,^{15,32} incluso en pacientes infériles con buen pronóstico reproductivo.³³ Sin embargo, Ma y su grupo no encontraron mejores tasas de embarazo en mujeres de edad avanzada, a quienes se les practicó la eclosión asistida en ciclos de ICSI, pero observaron mayor tasa de implantación.³⁴

En un metanálisis se obtuvieron 1,160 estudios relevantes, de los que solo 28 cumplieron con los criterios predeterminados por los autores. Se analizaron 4 subgrupos de estudio: 1) transferencia de embriones frescos de pacientes no seleccionadas o mujeres sin pobre pronóstico reproductivo, 2) embriones frescos transferidos a mujeres con fallas previas de implantación, 3) embriones frescos transferidos a mujeres de edad avanzada y 4) transferencia de embriones congelados de pacientes no seleccionadas o sin pobre pronóstico. Los resultados señalan que la eclosión asistida se correlaciona con elevadas tasas de embarazo en todas las pacientes (RR=1.11), con incremento

significativo en los subgrupos 2 (RR=1.73) y 4 (RR= 3.40). En la variable de embarazo múltiple se observó incremento significativo en todas las pacientes (RR=1.45), mayor aún en los subgrupos 2 (RR=2.53) y 4 (RR=3.40). Esto sugiere que la eclosión asistida se correlaciona con incremento en la tasa de embarazo clínico y múltiple en mujeres con fallas repetidas de implantación y en quienes se transfieren embriones congelados. Sin embargo, esta mejoría no se observó en el grupo de pacientes no seleccionadas o sin pobre pronóstico, ni en mujeres de edad avanzada.³⁵

Las pacientes con pobre pronóstico reproductivo, como las mencionadas en nuestros criterios de inclusión, se benefician de la eclosión asistida con láser, pues encontramos casi el doble de embarazos y de implantación al compararlo con pacientes de características similares, en quienes no se realizó la técnica de eclosión asistida. Además, estos resultados se asocian con el estudio de Hasan y colaboradores, quienes señalan que las pacientes con pobre pronóstico (mayores de 35 años de edad, zona pelúcida gruesa, antecedente de falla en la implantación con dos o más veces) tienen altas tasas de gestación (2.5 veces), implantación (2.4 veces) y embarazo en evolución (2.7 veces) que las pacientes sin eclosión asistida.³⁶



Las principales complicaciones de los diferentes métodos de eclosión asistida, como la degeneración embrionaria y mayor incidencia de gemelos monocigóticos, deben evaluarse y compararse con todo cuidado. Un estudio señala incremento del embarazo gemelar monocigótico en embriones llevados a eclosión asistida mecánica, quizás debido al tamaño de la apertura creada en la zona pelúcida.³⁷ En contraposición con este hallazgo, no se encontró tal incremento en embriones con eclosión asistida químicamente (aplicación de solución ácida de tyrode).³⁸ En nuestro grupo de estudio no encontramos ningún caso de gemelos monocigóticos, quizás por el adelgazamiento de la zona pelúcida en cuartos, con lo que se intenta evitar al máximo el atrapamiento del embrión.

Se han reportado casos de embarazos de alto orden fetal asociados con eclosión asistida, por ejemplo: un embarazo quíntuple, que consistió en un triamniótico monocoriónico triple relacionado con gemelos monoamnióticos.³⁹ Aunque es raro este hallazgo, cuando se realiza la ablación con la técnica en cuartos, debe considerarse reducir el número de embriones transferidos al efectuar la eclosión asistida. Por esta razón, en nuestro estudio no se observó tal complicación.

Se ha publicado que la eclosión asistida mejora las tasas de implantación de embriones obtenidos de cultivos *in vitro*, además de permitir la implantación de embriones anormales. Como consecuencia, la menor tasa de nacimientos puede deberse al alto número de embarazos que terminan en abortos tempranos por anomalías cromosómicas de los embriones. Sin embargo, el estudio de Ma y sus colaboradores,³⁴ donde realizaron pruebas citogenéticas en los abortos y en la sangre de cordón umbilical de los recién nacidos, demuestra la misma incidencia de malformaciones congénitas mayores en pacientes nacidos por ICSI, respecto de la población general.⁴⁰ Aunque todas las malfor-

maciones congénitas se registraron en el grupo de eclosión asistida, sugieren realizar estudios futuros para determinar si la técnica de solución ácida de Tyrode tiene algún efecto teratogénico en el desarrollo embrionario o alteraciones en el proceso epigenético del desarrollo embrionario temprano. Los autores concluyen que la eclosión asistida no aumenta la tasa de anomalías cromosómicas en los niños nacidos del grupo de estudio. Nuestros resultados señalan mayor incidencia de abortos en el grupo de estudio y no encontramos ninguna alteración congénita en los nacidos vivos.

Existe falta de consenso acerca de las ventajas de la eclosión asistida como técnica rutinaria. Sólo encontramos un estudio publicado en México, donde se utilizó solución ácida de Tyrode;⁴¹ por lo tanto, nuestro trabajo es el primero en publicarse en relación con el uso de láser en cuartos.

Hasta el momento no existe evidencia suficiente para recomendar la eclosión asistida de manera rutinaria en pacientes a quienes se efectúan técnicas de reproducción asistida. Los programas de reproducción deben evaluar a sus propias pacientes para determinar qué subgrupos se beneficiarán del procedimiento y evitar la eclosión asistida de forma universal en quienes se practica fertilización *in vitro*, porque este punto no estaría justificado.

En nuestro grupo de estudio encontramos mejoría significativa en las pacientes con pobre pronóstico reproductivo, por lo que recomendamos la eclosión asistida con láser mediante la técnica en cuartos; sin embargo, se requieren más estudios prospectivos para confirmar sus ventajas.

CONCLUSIÓN

La eclosión asistida con láser mediante la técnica en cuartos, efectuada entre el día 2 y 3,

incrementa significativamente la posibilidad de implantación y gestación en pacientes con pobre pronóstico reproductivo.

REFERENCIAS

1. Khalifa EA, Tucker MJ, Hunt P. Cruciate thinning of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992;7: 532-536.
2. Garside WT, Loret de Mola JR, Bucci JA, Tureck RW, Heyner S. Sequential analysis of zone thickness during in vitro culture of human zygotes: correlation with embryo quality, age, and implantation. *Mol Reprod Dev* 1997;47:99-104.
3. Loret De Mola JR, Garside WT, Bucci J, Tureck RW, Heyner S. Analysis of the human zona pellucida during culture: correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J Assist Reprod Genet* 1997;14:332-336.
4. Bertrand E, van den Bergh M, Englert Y. Clinical parameters influencing human zone pellucide thickness. *Fertil Steril* 1996;66:408-411.
5. De Felici M, Siracusa G. "Spontaneous" hardening of the zona pellucide of mouse oocytes during in vitro culture. *Gamete Res* 1982;6:107-113.
6. De Felici M, Salustri A, Siracusa G. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocyte during in vitro culture. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. *Gamete Res* 1982;12:227-235.
7. Zhang X, Rutledge J, Armstrong DT. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured in vitro in a serum-free medium. *Mol Reprod Dev* 1991;28:292-6.
8. Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990;90:547-553.
9. Cohen J, Malter H, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, Massey J. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988;2:162-169.
10. Liu HC, Cohen J, Alikani M, Noyes N, Rosenwaks Z. Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril* 1993;60:871-875.
11. Nikas G, Develioglu OH, Toner JP, Jones HW. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999;14:787-792.
12. Cohen J, Inge KL, Suzman M, Wiker SR, Wright G. Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989;51:820-827.
13. Cohen J, Elsner C, Kort H, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human an improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990;5:7-13.
14. Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992;7:685-691.
15. Antinori S, Panci C, Selman HA, Caffa B, Dani G, Versaci C. Zona thinning with the use of laser: a new approach to assisted hatching in humans. *Hum Reprod* 1996;11:590-594.
16. Nakayama T, Fujiwara H, Yamada S, Tastumi K, Honda T, Fujii S. Clinical application of a new assisted hatching method using a piezo-micromanipulator for morphologically low quality embryos in poor prognosis infertiles patients. *Fertil Steril* 1999;71:1014-1018.
17. Stein A, Rufas O, Amit S, Avrech O, Pinkas H, Ovadia J, et al. Assisted hatching by partial zona dissection of human pre-embryos inpatients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995;63:838-841.
18. Nocera D, Senn A, Rink K, Delacretaz G, Fajan S. Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48 micron diode laser beam: efficacy and safety of the procedure *Fertil Steril* 1995;64:604-611.
19. Park S, Kim EY, Yoon SH, Cheng KS, Lim JH. Enhanced hatching rate of bovine IVM/IVF/IVC blastocysts using a 1.48 micron diode laser beam. *J. Assist Reprod Genet* 1999;16:97-101.
20. Tinney GM, Windt M, Kruger TF, Lombard CJ. Use of a zona laser treatment system n assisted hatching: optimal laser utilization parameters. *Fertil Steril* 2005;84:1737-1741.
21. Stohmer H, Feichtinger W. Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1992;58:212-214.
22. Kanyo K, Konc J. A follow up study of children born after diode laser assisted hatching *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:176-180.
23. Primi M, Senn A, Montag M, van der Ven H, Mandelbaum J, Veiga A, et al. A European multicentre prospective randomized study to asses the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations. *Hum Reprod* 2004;19:2325-2333.
24. Schoper B, Ludwig M, Endenfeld J, Al-Hasani S, Diedrich K. Possible application of laser in assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 1999;14(Suppl 1):186-193.
25. Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A. A comparison of four techniques of assisted hatching. *Hum Reprod* 2002;17(5):1239-1243.
26. 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;16:2182-2186.
27. ASRM. The role of assisted hatching in *in vitro* fertilization: a review of the literature. A committee opinion. *Fertil Steril* 2008;90:S196-S198.



28. Gutiérrez AM, González OC, Cancino VP, Tovar CG, Garza MA, Pérez PE. En: Delgado UJ, Fernández del Castillo C. Ginecología y reproducción humana. Temas selectos. Capítulo: Micromanipulación de Gametos. 1^a ed. México: Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia, 2006;381-393.
29. González OC, Cancino VP, Pérez TA, Vargas MM, Martínez GS, Pérez PE, Gutiérrez AM. Inyección intracitoplásmica de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI) vs inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) en pacientes con falla repetida a ICSI. *Ginecol Obstet Mex* 2010;78(12):652-659.
30. Parikh FR, Kamat SA, Nadkarni S, Arawandekar D, Parikh RM. Assisted hatching in an in vitro fertilization programme. *J Reprod Fertil Suppl* 1996;50:121-125.
31. Montag M, van der Ven H. Laser-assisted hatching in assisted reproduction. *Croat Med J* 1999;40:398-403.
32. Zakova J, Ventruba P, Adler J, Travnik P, Nemcova S. Assisted hatching-a useful micromanipulation technic in women after repeated failure of embryo transfer. *Ceska Gynekol* 1996;61:6-9.
33. Hu Y, Hoffman DI, Maxson WS, Ory SJ. Clinical application of nonselective assisted hatching of human embryos. *Fertil Steril* 1996; 66:991-994.
34. Ma S, Rowe T, Yuen BH. Impact of assisted hatching on the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a prospective, randomized clinical trial and pregnancy follow-up. *Fertil Steril* 2006;85:895-900.
35. Martins WP, Rocha IA, Ferriani RA, Nastri CO. Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum Reprod Update* 2011;17;4:438-453.
36. Hassan NS, Sameh SS, Abdel FA. Assisted hatching- A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Assist Reprod Genet* 2003;20;8:332-342.
37. Herslang A, Paine T, Cooper GW, Scholl GM, Rawlinson K, Kvapil G. Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil Steril* 1999;71:144-146.
38. Meldrum DR, Wisot A, Yee B, Garzo G, Yeo L, Hamilton F. Assisted hatching reduces the age related decline in IVF outcome in women younger than age 43 without increasing miscarriage or monozygotic twinning. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:418-421.
39. Pantos K, Kokkali G, Petroutsou K, Lekka K, Malligiannis P, Koratzi A. Monochorionic triplet and monoamniotic twins gestation after intracytoplasmic sperm injection and laser-assisted hatching. *Fetal Diagn Ther* 2009;25:144-147.
40. Hansen M, Zuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002;346:725-730.
41. Carballo-Mondragón E, Durán-Monterrosas L, Campos-Cañas JA, González-De-Jesús LP, Kably-Ambe A. Eclosión asistida en pacientes con falla previa en la implantación embrionaria. *Ginecol Obstet Mex* 2012;80:509-513.