



Ecloación asistida: para mejorar la implantación del embrión. Revisión de la bibliografía

RESUMEN

En la mayoría de las especies la implantación del embrión representa el paso más crítico del proceso reproductivo; para que sea exitosa requiere: endometrio receptivo, embrión funcional en etapa de desarrollo adecuado e interacción entre los tejidos embrionarios y maternos. La eclosión es el proceso donde el blastocisto se deshace de la zona pelúcida para poder implantarse. La falla o deficiencia en este factor puede generar problemas reproductivos, aun con técnicas de reproducción asistida. La eclosión asistida es una técnica que se utiliza en los laboratorios de reproducción, con la intención de mejorar los resultados en los procesos de fecundación o fertilización *in vitro*. Esta técnica consiste en el debilitamiento o sección de la zona pelúcida mediante distintos métodos. Esta revisión sintetiza las indicaciones más comunes y técnicas utilizadas para realizar este procedimiento, y mejorar las tasas de éxito en las técnicas de reproducción asistida.

Palabras clave: eclosión asistida, reproducción asistida, implantación, embrión, técnica, transferencia.

Assisted hatching for improving embryo implantation. A bibliographical review

ABSTRACT

Embryo implantation represents the most critical step of the reproductive process in many species, to be successful requires a receptive endometrium, functional embryo at a stage of embryonic development and proper dialogue between embryonic and maternal tissues. Hatching is the process in which the blastocyst gets rid of the zona pellucida to be implemented. The failure in this factor can lead to reproductive problems, even under assisted reproduction techniques. Assisted hatching is a technique used in assisted reproduction laboratories to improve performance in the process of fecundation or *in vitro* fertilization. This technique is based on impairment or section of the zona pellucida using different techniques. In this review, the most common indications and techniques used to perform this procedure and improve success rates in assisted reproduction techniques are synthesized.

Key words: Assisted hatching, assisted reproduction, implantation, embryo, technique, transfer.

Carlos Alberto Hernández-Nieto¹
Luz Esterhany Soto-Cossío²
David Basurto-Díaz¹

¹ Residente de Ginecología y Obstetricia del programa multicéntrico de especialidades médicas ITESM-SSNL. Monterrey, Nuevo León, México.

² Residente de Medicina Interna, Hospital Ángeles del Pedregal, México DF.

Recibido: febrero 2015

Aceptado: marzo 2015

Correspondencia:

Dr. Carlos A. Hernández Nieto
Zapopan 283, int B10, Cumbres tercer sector
CP 69610, Monterrey, Nuevo León, México.
Tel. 8180103156
carlostpd@gmail.com

Este artículo debe citarse como

Hernández-Nieto CA, Soto-Cossío LE, Basurto-Díaz D. Eclosión asistida: para mejorar la implantación del embrión. Revisión de la bibliografía. Ginecol Obstet Mex 2015;83:232-239.



ANTECEDENTES

En la mayoría de las especies la implantación del embrión representa el paso más crítico del proceso reproductivo. Consiste en un fenómeno biológico único, por el que el blastocisto se une íntimamente a la superficie endometrial, para formar posteriormente la placenta que servirá de interfase entre el feto en crecimiento y la circulación materna.¹ La implantación exitosa requiere: que el endometrio sea receptivo, el embrión funcional en etapa adecuada de desarrollo e interacción sincronizada entre los tejidos embrionarios y maternos. En un ciclo normal, la implantación ocurre aproximadamente 9 días después de la ovulación (límites entre 6 y 12 días).²

Uno de los mecanismos importantes y necesarios para la implantación del embrión es la “eclosión” o *Hatching*, proceso en el que el blastocisto, a través de varios procesos, se deshace de la zona pelúcida. Las fallas en este mecanismo, debidas a anomalías intrínsecas (ya sea del blastocisto o de la zona pelúcida), son uno de los múltiples factores que limitan la eficiencia reproductiva en los seres humanos.³

La zona pelúcida es muy importante para el desarrollo del oocito y del embrión. Antes de la fertilización funciona como barrera específica para los espermatozoides e inmediatamente después de la fertilización actúa para evitar la polispermia.⁴ Además, protege al embrión en contra de la infiltración de leucocitos y microorganismos del aparato reproductor; otra función importante consiste en mantener el orden y acomodo celular en el embrión temprano para asegurar su desarrollo exitoso *a posteriori*.

La fertilización *in vitro* es un procedimiento costoso y consume tiempo, pero actualmente es el tratamiento más efectivo para la infertilidad. Las posibilidades de tener un recién nacido vivo

mediante esta técnica son incluso de 40%. La mayoría de las parejas aún permanece sin conseguir un nacido vivo a pesar de varios intentos de fertilización *in vitro*, lo que repercute en su calidad de vida y recursos económicos. Para este tipo de pacientes se han generado varias líneas de tratamiento coadyuvante, como la “eclosión asistida”, con la finalidad de incrementar las tasas de embarazo.⁵

Una observación importante que sirvió de antecedente para la introducción de la eclosión asistida, fue el hallazgo de mayores tasas de implantación en embriones fertilizados con técnicas microquirúrgicas.⁶ Está documentado que los embriones con zona pelúcida adelgazada tienen mayor tasa de implantación en comparación con embriones con zona pelúcida más gruesa.⁷ La mayor parte de los embriones no tiene éxito al eclosionar la zona pelúcida, debido a condiciones subóptimas al realizar las técnicas de reproducción asistida, específicamente la fertilización *in vitro*, porque puede interferir y prevenir el proceso natural de la eclosión, lo que resulta en fallas en la implantación.⁸

La eclosión asistida es una técnica que se utiliza en los laboratorios de reproducción con la intención de mejorar los resultados en los procesos de fecundación o fertilización *in vitro*. La eclosión asistida consiste en crear artificialmente un orificio en la zona pelúcida del embrión para facilitar el proceso natural de eclosión. Cohen y colaboradores⁸ fueron los primeros en desarrollar esta técnica, al observar que los embriones a los que habían realizado la disección parcial de la zona pelúcida, antes de ser transferidos al útero materno, tenían tasas de implantación más altas que los que no.^{9,10}

La eclosión asistida suele realizarse en el día 3 después de la fertilización mediante diferentes métodos, como por ejemplo: crear una apertura en la zona pelúcida, ya sea por perforación con

solución acidificada de Tyrode, disección parcial de la zona con una microaguja, fotoablación con laser o la utilización de un micromanipulador. De otra forma, la zona pelúcida puede adelgazarse artificialmente sin ser perforada o atravesada de múltiples formas (enzimas proteolíticas, solución ácida de Tyrode o energía laser).^{11,12}

Indicaciones para la eclosión asistida

Las indicaciones iniciales para la eclosión asistida son: edad de la paciente, zona pelúcida engrosada, FSH basal elevada, ciclos previos de fertilización *in vitro* fallidos o falla en la implantación, fragmentación excesiva y criotransferencia (Cuadro 1).¹³

Edad de la paciente

Se ha documentado que la tasa de implantación desciende progresivamente a partir de los 37 años de edad, y es más evidente después de los 40. El proceso de envejecimiento ovárico se asocia con aumento de alteraciones cromosómicas en el ovocito, que pueden afectar la capacidad del embrión para eclosionar *in vivo* e implantarse.¹⁴ Diversos autores recomiendan la eclosión asistida para mejorar la tasa y probabilidad de implantación en pacientes de 35 años de edad o mayores.¹⁵ Aún se discute este tema, pues en estudios clínicos se ha observado un aumento en la tasa de implantación en mujeres menores de 38 años, en quienes se realizó eclosión asistida posterior a ciclos de

Cuadro 1. Principales indicaciones para realizar la eclosión asistida

- Edad avanzada de la paciente
- Zona pelúcida engrosada ($>15 \mu\text{m}$)
- FSH basal el día 3 del ciclo ($>9 \text{ UI/mL}$)
- Ciclos fallidos de fertilización *in vitro*
- Fragmentación excesiva del embrión
- Criotransferencia

fertilización *in vitro* y aplicación de inyección intracitoplasmática de espermatozoides, pero no existen diferencias significativas después de este límite de edad.¹⁶

Zona pelúcida engrosada

El grosor de la zona pelúcida varía durante el desarrollo embrionario y a partir de las primeras divisiones celulares suele adelgazarse hasta una capa fina, que es más delgada en el estadio de blastocisto. Las fallas o deficiencias en este proceso de adelgazamiento pueden afectar la implantación exitosa del embrión.¹⁷ Teóricamente, al disminuir las necesidades metabólicas del embrión, como consecuencia del adelgazamiento de la zona pelúcida, se ha propuesto la eclosión asistida cuando el grosor de la zona pelúcida es mayor de 15 μm .¹⁸ Otros autores sugieren que la técnica de adelgazamiento mejora de manera importante las tasas de implantación, principalmente en mujeres añasas con zonas pelúcidas engrosadas y, al contrario, no se ha visto efecto benéfico en mujeres jóvenes. También se ha observado un efecto perjudicial en la tasa de embarazo cuando se aplica la técnica en embriones con zonas pelúcidas menores de 13 μm .¹⁹

Concentraciones elevadas de FSH

Se ha demostrado que durante los protocolos de estimulación ovárica existen bajas tasas de implantación en pacientes con elevada concentración de hormona folículo estimulante (FSH), con un punto de corte de 9 mIU/mL en el día 3 del ciclo menstrual.²⁰ Esta situación puede afectar el ambiente endocrino, paracrino y autocrino del folículo, y a la zona pelúcida del ovocito, afectando posteriormente su desarrollo.²¹ Las pacientes con valores séricos basales elevados de FSH parecen tener mayor tasa de embarazo después de la aplicación de técnicas de eclosión asistida.²²



Fallas en la implantación o ciclos previos fallidos

Se ha comprobado que una paciente que previamente tuvo 2 fracasos de implantación, independientemente de su edad, tiene resultados satisfactorios con la técnica de eclosión asistida; por lo tanto, algunos autores la han propuesto como la técnica indicada para mejorar la tasa de éxito en intentos posteriores, porque favorece que la implantación del embrión en desarrollo sea más temprana al permitir una sincronía más adecuada entre el embrión y el endometrio.²³ Cuando se transfieren embriones sin zona pelúcida a pacientes con 2 ciclos previos fallidos de fertilización *in vitro* se reporta una incidencia de 53% de embarazo y 33% de implantación exitosa.²³

Fragmentación excesiva

Los fragmentos celulares son porciones de citoplasma carentes de núcleo y rodeados de membrana.²⁴ Estos fragmentos se forman durante la mitosis, en el proceso de las 2 primeras divisiones celulares, y son comunes en los embriones humanos, aunque se desconocen los mecanismos de señalización extrínseca e intrínseca que los genera o induce su formación. En teoría, cuanto mayor es el grado de fragmentación menor es la capacidad del embrión para dividirse adecuadamente. Por lo tanto, los embriones con menor cantidad de fragmentos son los más competentes, desde el punto de vista del desarrollo, y son los que prioritariamente se seleccionan para la transferencia en técnicas de reproducción asistida.²⁵

El potencial de implantación de los embriones fragmentados no solo se determina por su grado de fragmentación, sino también por su tamaño y distribución dentro del embrión. Algunos investigadores realizan la eclosión asistida con eliminación dirigida de los fragmentos, como técnica para restablecer la capacidad de

desarrollo en embriones con más de 25% de fragmentación, independientemente de su tamaño y distribución. De esta forma se restablece la relación espacial de los blastómeros, el contacto entre las células y los planos normales de división del embrión, generando así un embrión de mayor calidad.¹¹ No obstante, otros autores refieren que cualquier embrión con fragmentación no logrará restablecer su capacidad de desarrollo aunque se realice esta técnica de aspiración fragmentaria, porque ciertos patrones de fragmentación pueden relacionarse con la pérdida parcial o total de proteínas reguladoras necesarias para el desarrollo adecuado del embrión.²⁶

Criotransferencia

Las tasas de embarazo e implantación en transferencias de embriones criocongelados son habitualmente bajas comparadas con las de embriones en fresco. El endurecimiento de la zona pelúcida y los blastómeros lisados después del proceso de congelación y descongelación afectan la viabilidad embrionaria. La eclosión asistida restablece la capacidad de desarrollo e implantación en estos embriones cuando son descongelados.²⁷ Algunos estudios demuestran que la eliminación de los fragmentos intracelulares de estos embriones tiene efectos benéficos en la tasas de implantación.²⁸

Técnicas de eclosión asistida

El Cuadro 2 muestra las ventajas y desventajas de la técnica de eclosión asistida.¹³

Eclosión asistida mecánicamente (disección parcial de zona): esta técnica fue descrita por Cieslak y colaboradores en 1999.²⁹ El embrión se inmoviliza en posición con succión gentil ejercida por una pipeta, mientras que la zona pelúcida es atravesada por una microaguja en el espacio perivitelino más amplio y dirigida

Cuadro 2. Principales ventajas y desventajas de las distintas técnicas de eclosión asistida¹³

Método	Ventajas	Desventajas
Mecánicos	No hay exposición a calor o químicos potencialmente embriotóxicos; no se ha demostrado que afecte el desarrollo embrionario; son procedimientos relativamente económicos.	Requiere tiempo, doble micromanipulador, adiestramiento específico; al realizar la disección de la zona pelúcida se pueden lesionar los blastómeros.
Láser	No requiere micropipetas o manipuladores; genera resultados consistentes y tamaño de apertura de la zona pelúcida controlado; provoca menos grado de lisis de los blastómeros comparado con los medios químicos; es un método rápido y fácil de realizar.	El tiempo de exposición prolongado puede dañar los embriones; equipo muy costoso; la perforación realizada puede causar constrictión y lisis del blastómero.
Químicos	El tamaño de la perforación de la zona pelúcida es mayor y favorece la eclosión; su costo es relativamente bajo.	Requiere doble micromanipulador; no se puede regular el tamaño de la perforación; pueden ser embriotóxicos.

tangencialmente para evitar dañar las células del interior. En ese momento, el embrión es sostenido solo con la microaguja y posteriormente es liberado de ella para ser rotado sobre su eje; después se vuelve a tomar el embrión con la pipeta, para sujetarlo, y se realiza nuevamente un corte en la zona pelúcida de manera perpendicular al primer corte, creando una forma de "X" (disección en 3D), para después regresar el embrión al medio de cultivo y almacenarlo hasta su transferencia.²⁴ (Figura 1)

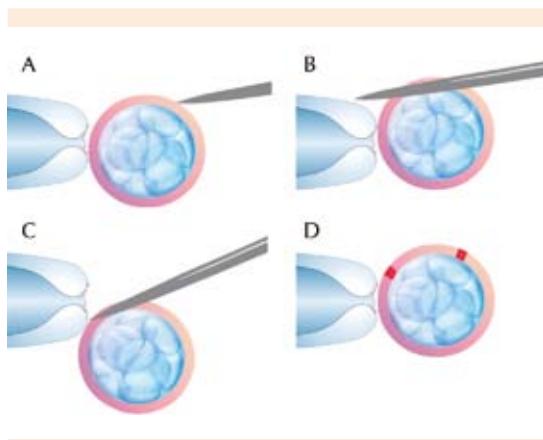


Figura 1. Disección parcial de zona. El embrión se sostiene con el micromanipulador y la forma en que es atravesada la zona pelúcida con la microaguja origina dos orificios de manera tangencial.

Ecloación asistida con solución acidificada de Tyrode:

descrita por Cohen y colaboradores en 1990.⁶ Los embriones se sujetan e inmovilizan con una pipeta colocada en posición de las 9 horas del reloj. De manera contralateral, a las 3 horas del reloj, se coloca una pipeta de 10 µm que contiene la solución acidificada de Tyrode con pH 2.35 (ZD-10 Ref 1006; Vitrolife Fertility Systems, Gothenburg, Sweden); la pipeta se ubica en una zona con un espacio perivitelino amplio y se libera paulatina y controladamente la solución, crea un defecto en la zona pelúcida de aproximadamente 30 µm; después, los embriones se enjuagan en repetidas ocasiones en el medio de cultivo estándar para retirar el exceso de solución (pues es altamente embriológica) y permanecen preparados para la transferencia.²⁴ (Figura 2)

Ecloación asistida con láser (fotoablación):

para esta técnica se utiliza un láser diodo de 1,480 nm, en una mira controlada por computadora (IVF Worksstation and Zona Laser Treatment System, Hamilton Thorne Instruments, Beverley, MA, USA), unida a un microscopio invertido Olympus IX-70. El programa de cómputo está diseñado para un posicionamiento fácil, enfoque y medición de los embriones con alineamiento para el láser, que tiene 3 intensidades de energía: baja (35mW), media (45mW) y alta (55mW)

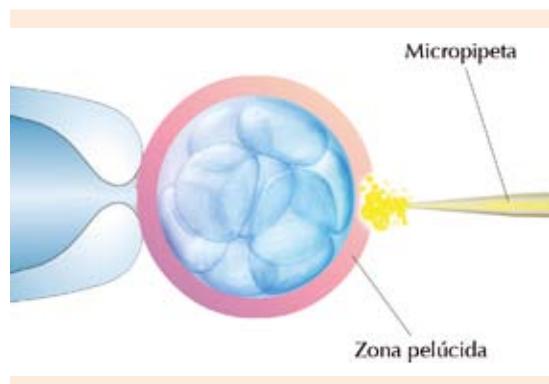


Figura 2. Eclosión asistida con solución acidificada de Tyrode. Adelgazamiento de la zona pelúcida al contacto con la solución acidificada de Tyrode.

que se disparan en un pulso de 25 m. La baja intensidad perfora una capa delgada ($<10 \mu\text{m}$), la intensidad media se utiliza en la mayor parte de los procedimientos y cubre un área de 10 a 15 μm , y el de alta intensidad se requiere para zonas pélúcidas más gruesas ($>15 \mu\text{m}$).²⁴ Para realizar esta técnica se han propuesto otros láseres de distintas longitudes de onda; está demostrado que la radiación infrarroja es la más apropiada, en especial cuando se consideran los riesgos de mutagénesis que provoca esta técnica.^{30,31} (Figura 3)

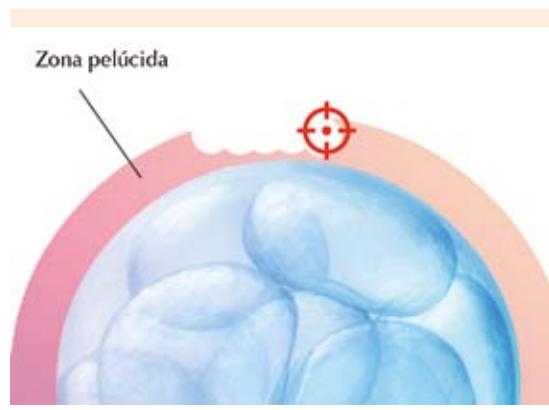


Figura 3. Eclosión asistida con láser. Destrucción de la zona parcial mediante láser guiado por computadora.

Adelgazamiento de la zona pelúcida con pronasa: descrita por Fong y colaboradores en 1998. La solución pronasa (Proteasa, Sigma P-8811; Sigma Aldrich Co Ltd, Irvine, UK) adelgaza la zona pelúcida sin atravesarla completamente.³⁸ La efectividad de esta técnica comprende embriones expuestos con expansión de la zona en el lugar de adelgazamiento, perforación o desaparición de la zona pelúcida o espacio perivitelino aumentado de tamaño. Una vez localizados estos datos, los embriones están listos para incubarse en el medio de cultivo y, posteriormente, ser transferidos.³²

Otras técnicas: recientemente se realizaron estudios de eclosión asistida con vibración generada por pulsos piezoeléctricos o piezomicromanipulador, que tiene precisión adecuada y ofrece la posibilidad de controlar el defecto causado en la zona pelúcida, sin necesidad de utilizar químicos que puedan resultar embriotóxicos.³³

En general, a propósito de las distintas técnicas de eclosión asistida, algunos estudios no demuestran resultados con significación estadística clara que favorezcan una técnica en contra de otra comparándolas con grupos control. Es necesario realizar más estudios prospectivos, aleatorizados y con mayor número de pacientes para crear y estandarizar guías de tratamiento.^{12,34,35}

CONCLUSIÓN

La técnica de eclosión asistida, o *assisted hatching*, mejora significativamente la probabilidad de embarazo clínico y la tasa de recién nacido sano en mujeres con características específicas (mayores de 40 años de edad) y ciclos fallidos de fertilización *in vitro* y no incrementa la tasa de embarazo múltiple. Existe suficiente evidencia para recomendar la eclosión asistida como técnica de rutina.

En la actualidad, aunque son diferentes los métodos para la eclosión asistida, los distintos criterios de selección de pacientes y embriones, el reducido número de casos en los estudios o deficiencias estadísticas, además de la escasa cantidad de embriólogos adiestrados en este procedimiento, resulta muy difícil valorar los resultados entre los distintos grupos. En todos los trabajos de investigación es necesario estandarizar la metodología y los criterios de inclusión, con la finalidad de establecer el beneficio verdadero de la técnica y emitir recomendaciones basadas en evidencia sólida.^{12,34,35}

REFERENCIAS

1. Denker HW. Implantation: A cell biological paradox. *J Exp Zool* 1993;266:541-58
2. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the Conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:1796-9
3. Wassarman PM. Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod* 1992;46:186-91.
4. Suzuki H, Togashi M, Adachi J, Toyoda Y. Developmental ability of zona-free mouse embryos is influenced by cell association at the 4-cell stage. *Biol Reprod* 1995;53:78-83.
5. Zeyneloglu HB, Onalan G. Remedies for recurrent implantation failure. *Semin Reprod Med* 2014;32(04):297-305.
6. Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990;5:7-13.
7. Cohen J, Inge KL, Suzmann M, Wiker SR, Wright G. Video cinematography of fresh and cryopreserved embryos: A retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989;51:820.
8. Cohen J, Alikani M, Malter HE, Adler A, Talansky BE, Rosenwaks Z. Partial zona dissection or subzonal sperm insertion: microsurgical fertilization alternatives based on evaluation of sperm and embryo morphology. *Fertil Steril* 1991;56:696-706.
9. Schiewe MC, Araujo E, Asch RH, Balmaceda JP. Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos. *J Assist Reprod Genet* 1995;12:2-7.
10. Martins WP1, 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):438-53.
11. Moreno JM, López-Gálvez JJ, Lloret M, Lobato JJ, y col. Evaluación de la técnica de eclosión asistida. *Rev Int Androl* 2008;6(1):62-66.
12. Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology, Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. The role of assisted hatching *in vitro* fertilization: a review of the literature. A Committee opinion. *Fertil Steril* 2008;90:S196-S198.
13. Yen SS, Jaffe RB, Strauss JF, Barbieri RL. Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012.
14. Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosomal abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382.
15. 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.
16. TS Ghobara, Cahill DJ, Ford WC, Collyer HM, et al. Assisted hatching method affects implantation rate. *Reprod Biomed Online* 2006;13(2):261-7.
17. Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod* 2001;16:2166-70.
18. 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.
19. Eun DS, Park JY, Kong ES, et al. Comparison of pregnancy rate according to the zona pellucida thickness between biochemical assisted hatching group and nonassisted hatching group. *Fertil Steril* 2000;74:S151.
20. 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 Genetics* 1997;14:332.
21. Nadir Ciray H, Bener F, Karagenc L, Ulun U, Bahceci M. Impact of assisted hatching on ART outcome in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:2546-2549.
22. Fasouliotis SJ, Simon A, Laufer N. Evaluation and treatment of low responders in assisted reproductive technology: a challenge to meet. *J Assist Reprod Genet*. 2000;17:357-73.
23. Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Oliveira JB, et al. Implantation failures: success of assisted hatching with quarter laser zona thinning. *Reprod Biomed Online* 2005;10:224-9.
24. Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, et al. A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Hum Reprod* 2002;17:1239-1243.



25. Dale B, Tosti E, Iaccarino M. Is the plasma membrane of the human oocyte reorganized following fertilization and early cleavage? *Zygote* 1995;3:31.
26. Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod BioMed Online* 2003;6:232-31.
27. Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod* 1999;14:429-47.
28. Moreno JM, Gil L, López-Gálvez JJ, Lloret M, Sánchez R, Rueda J. Eclosión asistida con aspiración fragmentación en criotransferencias de dos embriones. III Congreso de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción. Zaragoza, 2005;2(10).
29. Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Sheleg S, Verlinsky Y. Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil Steril* 1999;71:308-13.
30. Hsieh YY, Huang CC, Cheng TC, Chang CC, Tsai HD, Lee MS. Laser-assisted hatching of embryos is better than the chemical method for enhancing the pregnancy rate in women with advanced age. *Fertil Steril* 2002;78:179-182.
31. Ma B, Wang Y, Zhang H, Zhang X. A study comparing three different laser-assisted hatching techniques. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2014;41(1):37-40.
32. Fong C, Bongso A, Ng S, Anan Kumar J, Trounson A, Ratnam S. Blastocyst transfer after enzymatic treatment of the zona pellucida: improving in-vitro fertilization and understanding implantation. *Hum Reprod* 1998;13:2926-2932.
33. Nakayama T, Fujiwara H, Tastumi K, Fujita K, Higuchi T, Mori T. A new assisted hatching technique using a piezo-micromanipulator. *Fertil Steril* 1998;69:784-788.
34. Carballo-Mondragón E, Durán-Monterrosas L, Campos-Cañas JA, González de Jesús P, Kably-Ambe A. Eclosión asistida en pacientes con falla previa en la implantación embrionaria. *Ginecol Obstet Mex* 2012;80(8):509-513.
35. Carney SK1, Das S, Blake D, Farquhar C, Seif MM, Nelson L. Assisted hatching on assisted conception (*in vitro* fertilization [IVF] and intracytoplasmic sperm injection [ICSI]). *Cochrane Database Syst Rev* 2012;12:CD001894.