

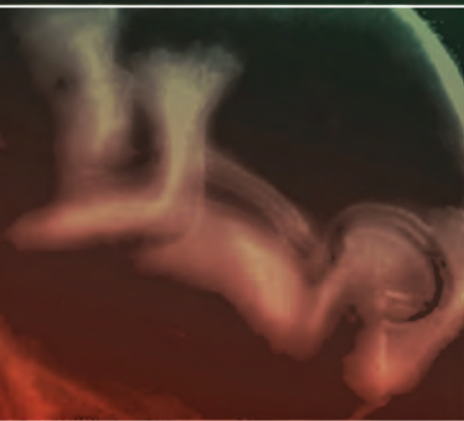
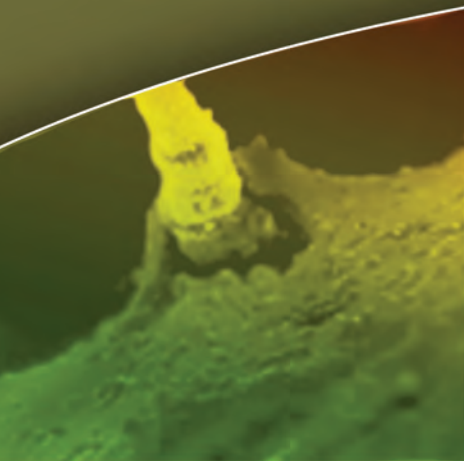
Volume 15  
Number 5  
Sep-Oct 2011  
ISSN 1517-5693

# JBRA

## Assisted Reproduction



JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"



# Avaliação dos resultados do “assisted hatching” em ciclos de fertilização *in vitro* em mulheres acima de 35 anos

## Outcomes of assisted hatching in women older than 35 years undergoing in vitro fertilization

Ana Márcia de Miranda Cota<sup>1</sup>, Alexon Melgaço Racilan<sup>2</sup>, Maria Clara Magalhães dos Santos Amaral<sup>1</sup>, Rívia Mara Lamaita<sup>1</sup>, Ana Luísa Menezes Silva<sup>3</sup>, João Pedro Junqueira Caetano<sup>1</sup>

Membro do corpo clínico  
Residente em Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Mater Dei  
Bióloga

\*Apresentado como Poster no 10° Congresso Geral da Rede latinoamericana de Rep Assistida

Clínica Pró-Criar / Mater Dei

### RESUMO

**Objetivo:** avaliar o impacto do “assisted hatching” sobre os resultados da fertilização *in vitro* em mulheres acima dos 35 anos.

**Métodos:** foram avaliados retrospectivamente 232 ciclos de fertilização *in vitro* em pacientes acima dos 35 anos. As pacientes foram divididas em 2 grupos: grupo assisted hatching e grupo controle.

**Resultados:** A média de idade foi semelhante entre os grupos ( $38 \pm 2,12$  para o grupo assisted hatching e  $37,86 \pm 2,17$  para o grupo controle,  $P=0,58$ ). Quando comparado com o grupo controle, as pacientes que realizaram o assisted hatching

apresentaram significativamente um menor número de oócitos puncionados e de oócitos maduros, além de uma menor taxa de fertilização (74% x 82%,  $P=0,016$ ) e de congelamento (21% x 36%,  $P=0,007$ ). Além disso, as pacientes do grupo assisted hatching já haviam realizado significativamente mais ciclos de FIV prévios, além de terem utilizado uma maior quantidade de ampolas de gonadotrofinas. No entanto, a taxa de implantação (18% x 20%) e taxa de gravidez (37% x 41%) foram significativamente semelhantes.

**Conclusões:** as pacientes que realizaram o “assisted hatching” apresentavam características referentes ao ciclo da FIV que indicavam um pior prognóstico para a gravidez, mas mesmo assim obtiveram uma taxa de implantação e de gravidez semelhantes às das pacientes do grupo controle.

Palavras-chave: fertilização *in vitro*, gravidez, eclosão assistida

### ABSTRACT

**Objective:** To assess the impact of assisted hatching on the results of in vitro fertilization in women older than 35 years.

**Methods:** 232 cycles of in vitro fertilization in patients older than 35 years old were retrospectively evaluated. The patients were divided in 2 groups: assisted hatching group and control group.

**Results:** The mean age was similar in both groups ( $38 \pm 2,12$  and  $37,86 \pm 2,17$ , assisted hatching group and the control group, respectively,  $P = 0,58$ ). When compared to the control group, the patients who had done assisted hatching showed significantly less oocytes retrieved and metaphase II oocytes, and worse fertilization rate (74% x 82%,  $P=0,016$ ) and embryo freezing rate (19% x

35%,  $P = 0,007$ ). Besides this, the patients treated with assisted hatching had already done significantly more previous IVF cycles, and used more ampoules of gonadotropins. There were no statistical differences in implantation (18% x 20%) and pregnancy rates (37% x 41%) between both groups.

**Conclusions:** the patients who had the “assisted hatching” showed characteristics relating to the cycle of IVF indicating a worse prognosis for pregnancy, but even so, they obtained an implantation and pregnancy rate similar to the control group patients.

Keyword: assisted hatching, in vitro fertilization, pregnancy

### INTRODUÇÃO

O “hatching” ou eclosão do blastocisto é uma etapa importante para que ocorra a implantação embrionária. Falha nesse processo, seja devido à qualidade do próprio blastocisto ou da zona pelúcida, pode ser um dos fatores que diminuem a eficácia da reprodução assistida, explicando a baixa taxa de implantação embrionária nos ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) (Cohen, 1990). O sucesso das técnicas de reprodução assistida depende da estreita e íntima relação e interação entre o(s) embrião(ões) transferido(s) e o endométrio. Especula-se que a falha de implantação dos embriões deve-se ao fato da incapacidade desses saírem da zona pelúcida (ZP), seja devido a alguma alteração da ZP ou a falha no desenvolvimento embrionário. Portanto, o argumento fisiológico para realizar o “assisted hatching” (AH) é que ele poderia aumentar a comunicação entre o embrião e o endométrio, resultando em melhores taxas de implantação e de gravidez ((Balaban et al., 2002; Feng et al., 2009). Assim, o AH foi desenvolvido em 1990 com a finalidade de realizar

um orifício na ZP artificialmente no intuito de melhorar a taxa de implantação e taxa de gravidez em ciclos de FIV (ASRM, 2008; Cohen et al., 1990).

Existem várias técnicas de se realizar o AH: mecânica, química ou a laser (Selva, 2000). Cada método tem suas vantagens e desvantagens. Um estudo comparando as 3 técnicas demonstrou que o AH químico utilizando solução Tyrode e o AH a laser apresenta melhores taxas de gravidez quando comparado com método mecânico (Feng et al., 2009). Normalmente, o AH é realizado no embrião no estágio de clivagem, geralmente no dia 3 após a fertilização.

O AH não é um procedimento isento de riscos. Pode haver risco de lesão do embrião, além de alguns estudos evidenciarem um aumento na taxa de gemelaridade monozigótica (Schieve et al., 2000; Hershlag, 1999).

Assim, a utilização do AH como técnica universal, isto é, empregada em todos os ciclos de FIV ainda não está estabelecida. Existem várias controvérsias na literatura sobre a utilização do AH: se há melhora nas taxas de gravidez e de nascido vivo e quais as pacientes se beneficiariam com a técnica. Existem situações em que o AH estaria indicado: pacientes de prognóstico ruim, tais como, idade materna avançada, ZP espessa, níveis elevados de FSH basal (>15 mIU/mL) e falhas em ciclos de FIV (Zaninovic, 1998; ASRM, 2008).

Desde que foi descrito, o AH vem sendo utilizado no intuito de melhorar as taxas de gravidez e de nascimentos, mas muitas vezes os resultados são discordantes.

O objetivo desse estudo é avaliar o impacto do AH sobre os resultados da FIV em mulheres acima dos 35 anos.

## MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo onde foram avaliadas pacientes acima dos 35 anos submetidas a ciclos de FIV na Clínica Pró Criar/Mater Dei, no período de janeiro/2009 a maio/2010. O projeto do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Mater Dei. Para uma maior homogeneização da amostra as pacientes foram pareadas de acordo com a idade e com o número de embriões transferidos.

Foram incluídas as pacientes que tiveram os embriões transferidos no dia 3 após a punção folicular. Não foram incluídas as pacientes que realizaram a transferência de blastocisto.

As indicações do AH foram: ZP espessa, idade materna avançada (> 38 anos), falhas em ciclos de FIV anterior e FSH > 10UI/mL.

As pacientes foram divididas em 2 grupos: pacientes que realizaram o AH (grupo AH) e pacientes que não realizaram (grupo controle).

Todas as pacientes incluídas no estudo passaram por uma hiperestimulação ovariana controlada através dos protocolos:

- Protocolo longo: as pacientes receberam o agonista do GnRH leuprolida depot (Lectrum® Novartis) na dosagem de 3,75mg, intra-muscular, no meio da fase lútea do ciclo anterior ao da estimulação para que ocorresse o bloqueio hipofisário. Após 14 dias de uso do análogo do GnRH, comprovando-se o bloqueio hipofisário através de ultrassonografia endovaginal, iniciou-se a estimulação ovariana.

- Protocolo antagonista: a estimulação ovariana iniciou no segundo dia do ciclo menstrual. O antagonista do GnRH (Orgalutran® Organon) foi iniciado quando observado pelo menos um folículo com diâmetro maior de 14mm, sendo administrado na dosagem de 0,25mg/dia até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) para desencadear a maturação oocitária.

- Protocolo micro-flare: a estimulação ovariana iniciou no segundo dia do ciclo menstrual, juntamente com microdoses (50mcg) do análogo de GnRH (Lectrum® Novartis), aplicadas a cada 12 horas, via subcutânea, até o dia do hCG.

A hiperestimulação ovariana foi realizada com a administração de gonadotrofina menopáusic humana (hMG) (Merional® Meizler ou Menopur® Ferring), sendo a dose ajustada para cada paciente de acordo com a contagem dos seus folículos antrais. Foram realizadas ultrassonografias endovaginais seriadas para avaliação do recrutamento, desenvolvimento e crescimento folicular, além da avaliação endometrial.

Quando pelo menos 3 folículos com diâmetro  $\geq 17$ mm foram visualizados ao ultra-som foi administrado hCG (Choriomon® Meizler) na dosagem de 10.000UI, subcutâneo, para desencadear a maturação oocitária. A punção folicular guiada por ultrassonografia endovaginal para coleta dos oócitos foi agendada, então, para 34 a 36 horas após. Cerca de 4 a 6 horas após a punção folicular a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) foi realizada, de acordo com a técnica descrita de Palermo et al. (1992).

O suporte de fase lútea foi iniciado no dia seguinte ao da punção folicular com a utilização de progesterona micronizada (Evocanil® Zodiac) na dosagem de 600mg/dia via vaginal.

A técnica do AH foi realizada em todos os embriões selecionados para transferência no terceiro dia pós-fertilização, 1 a 3 horas antes da transferência embrionária. Para a abertura da zona pelúcida, foi utilizado o ácido Tyrode's (Irvine Scientific). Uma micropipeta *zona drilling* (Cook®) foi preenchida com o ácido, o qual foi expelido gentilmente com objetivo de realizar uma pequena abertura na zona pelúcida. Todo o ácido excedente ao redor de cada embrião foi aspirado rapidamente. Os embriões foram lavados três vezes em meio HTF modificado com Hepes (Irvine Scientific) e recolocados em microgotas de meio de cultura (Global® - LifeGlobal), até o momento da transferência.

Os embriões excedentes permaneciam em cultivo até o 5º ou 6º dia. Os embriões que alcançassem o estágio de blastocisto nessa data eram congelados.

Quatorze dias após a punção folicular foi realizado a dosagem sérica do hCG. Quando positivo, foi agendado um ultra-som em 14 dias para diagnóstico de gravidez clínica e definição do número de sacos gestacionais.

## RESULTADOS

Foram avaliados 232 ciclos de FIV. A idade média das pacientes foi de  $37,90 \pm 2,16$  anos. O tempo médio de infertilidade foi de  $3,89 \pm 2,52$  anos, sendo que em 63,36% (n=147) das pacientes a infertilidade era primária. Dentre as causas da infertilidade: 33,08% foram por fator masculino, 27,19% causa mista, 14,47% fator tubário, 8,77% endometriose, 7,89% infertilidade sem causa aparente e em 6,58% a causa foi ovariana. O protocolo longo foi utilizado em 48% dos ciclos, sendo que 33% das pacientes utilizaram o protocolo micro-flare e 19% o antagonista.

O AH foi realizado em 63 pacientes (27,16%). A idade média foi semelhante entre os grupos ( $38 \pm 2,12$  grupo AH e  $37,86 \pm 2,17$  grupo controle,  $P=0,58$ ). Quando comparado com o grupo controle, as pacientes que realizaram o AH apesar de apresentarem número de folículos antrais estatisticamente semelhante, obtiveram um número significativamente menor de oócitos puncionados e de oócitos maduros (MII), além de uma menor taxa de fertilização e de congelamento. Além disso, as pacientes do grupo AH já haviam realizado significativamente mais ciclos de FIV prévios, além de terem utilizado uma maior quantidade de hMG na hiperestimulação ovariana. O número médio de embriões transferidos foi semelhante entre os grupos ( $2,51 \pm 0,67$  grupo AH x  $2,57 \pm 0,63$

grupo controle,  $P=0,48$ ). Entretanto, quando comparado o grupo controle com o grupo AH, a taxa de clivagem, de implantação e de gravidez foram significativamente semelhantes (Tabela 1).

Quando avaliadas apenas as pacientes que realizaram o AH, não houve diferença significativa entre as características das pacientes que engravidaram ou não (Tabela 2). Com relação ao protocolo de estimulação utilizado observa-se uma maior porcentagem de pacientes que utilizaram o protocolo micro-flare no grupo AH quando comparado com o grupo controle, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

Desde que descrito pela primeira vez em 1990 por Cohen, o AH vem sendo utilizado de uma forma em geral, para casais com idade materna avançada, níveis elevados de FSH, falhas repetidas em ciclos de FIV anteriores ou para oócitos com ZP espessada (Zaninovic, 1998; ASRM, 2008; Cohen et al., 1992).

Baseado nos resultados encontrados no presente estudo percebe-se que o AH foi indicado para pacientes com um pior prognóstico quando comparado com as pacientes que não realizaram o procedimento. Tal fato está de acordo com o recomendado por alguns autores (Martins et al., 2010; ASRM, 2008; Cohen et al., 1992; Zaninovic, 1998). Apesar de apresentarem idade e níveis de FSH semelhantes, as pacientes que realizaram o AH necessitaram de uma maior quantidade de gonadotrofinas para a estimulação ovariana. Além disso, as pacientes do grupo AH já haviam sido submetidas a um maior número de ciclos de FIV, ou seja, no grupo AH havia um maior número de pacientes com falhas anteriores em ciclos de FIV. Quando comparados os resultados oocitários, nota-se uma quantidade significativamente menor de oócitos totais e MII, além de uma menor quantidade de oócitos fertilizados, o que demonstra uma menor resposta ovariana à hiperestimulação e um pior prognóstico para a gravidez para as pacientes que realizaram o AH. Além disso, as pacientes do grupo AH tiveram uma taxa de congelamento embrionário significativamente menor que as pacientes do grupo controle reforçando ainda mais que eram pacientes de prognóstico mais reservado.

Quando avaliado o protocolo de estimulação, percebe-se que 43% das pacientes do grupo AH utilizaram o protocolo micro-flare, contrapondo com apenas 29% do grupo controle, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. No nosso serviço esse tipo de hiperestimulação é reservado para as pacientes com uma menor reserva ovariana.

No entanto, apesar desses resultados demonstrarem que as pacientes que realizaram o AH tinham um prognóstico pior que as pacientes do grupo controle, obteve-se uma taxa de implantação e de gravidez semelhante entre os grupos.

A taxa de implantação foi semelhante entre os grupos (18% x 20%,  $P=0,65$ ), não evidenciando diferença com o AH. Na literatura, alguns autores relatam uma melhora na taxa de implantação quando se realiza o AH. Ma et al., em seu estudo demonstraram uma taxa de implantação significativamente maior nas pacientes que realizaram AH quando comparado com o grupo controle (16% x 8%,  $P=0,006$ ), sendo essa diferença mais pronunciada em mulheres acima dos 35 anos. No entanto, a taxa de gravidez clínica foi semelhante entre os grupos, com leve tendência a um aumento com o AH ( $P = 0,07$ ). Além disso, foi observado um aumento de 6% na taxa de nascido vivo com o AH (24% x 18%), sem alcançar, no entanto uma significância estatística (Ma et al., 2006).

**Tabela 1.** Comparação entre as características gerais e do ciclo de FIV entre o grupo AH e o grupo controle

	AH (n = 96)	Controle (n = 196)	P-valor
Idade (em anos)	38,00±2,12	37,86±2,17	0,58
Tempo de infertilidade (em anos)	3,82±2,70	3,91±2,47	0,59
FSH em UI/mL	9,23±3,43	8,77±3,31	0,34
Número de ciclos prévios	1,11±1,67	0,40±0,75	< 0,001
Folículos antrais	10,39±4,14	11,29±4,48	0,12
Total de ampolas hMG	48,19±11,41	41,45±10,59	< 0,001
Tempo de estimulação (em dias)	11,10±1,21	10,77±1,37	0,15
Número de folículos	8,22±5,90	8,79±5,64	0,25
Número de oócitos	8,63±6,39	10,35±6,63	0,02
Número de MII	6,60±5,08	7,92±5,14	0,04
Taxa de oócitos maduros	80%	79%	0,60
Número de 2PN	4,92±4,43	6,36±4,35	0,002
Número de embriões transferidos	2,51±0,67	2,57±0,63	0,48
Taxa de fertilização	74%	82%	0,016
Taxa de clivagem	96%	94%	0,09
Porcentagem de bons embriões no dia 3	79%	78%	0,46
Taxa de implantação	18%	20%	0,65
Taxa de gravidez	37%	41%	0,64
Taxa de congelamento	21%	36%	0,03
Taxa de abortamento	18%	18%	0,76
Taxa de gestação múltipla	13%	21%	0,42

Valores expressos em média±DP ou em porcentagem

No presente estudo, a taxa de gravidez clínica foi de 37% para o grupo AH e 41% para grupo controle, não havendo diferença significativa entre eles. Tal achado está de acordo com o encontrado por alguns autores. Recente meta-análise não demonstrou diferença significativa entre taxa de gravidez clínica (44,41% x 41,30% OR 1,12; 95% IC 0,94–1,34,  $P=0,19$ ) e taxa de nascido vivo (36,33% x 34,79%, OR 1,05; 95% IC 0,85–1,30,  $P=0,63$ ) para as pacientes que realizaram o AH (Martins et al., 2010). Um estudo utilizando AH em pacientes com idade inferior a 38 anos, encontrou resultados semelhantes em relação à taxa de gravidez (47% x 50%,  $P=0,86$ ) e taxa de nascido vivo (46% x 45%,  $P=1,00$ ) entre o grupo AH e o grupo controle, ou seja, o AH não melhorou significativamente os resultados de FIV em pacientes jovens (Hagemann et al., 2010). No entanto, em 2009, Das Sangeeta et al. em sua meta-análise envolvendo 28 estudos randomizados com 3646 mulheres demonstrou um aumento significativo nas taxas de gravidez com o AH (OR 1,29, 95% IC 1,12-1,49), sem, no entanto, haver melhora na taxa de nascido vivo (OR 1,13, 95% IC 0,83-1,55) (Das Sangeeta et al., 2009). Resultados semelhantes foram descritos por Edi-Osagie e colaboradores em sua revisão sistemática (OR 1,21 para taxa de nascido vivo, 95% IC 0,82-1,78 e um OR 1,63 para taxa de gravidez, IC 1,27-2,09) (Edi-Osagie et al., 2003).

Com relação à taxa de gestação múltipla, foram encontrados resultados semelhantes entre os grupos, o que é comparável ao demonstrado por alguns estudos. Hagemann e colaboradores encontraram uma maior incidência de gestação múltipla com o AH (33% grupo AH x 18% grupo controle,  $P=0,23$ ), sem no entanto, haver diferença significativa (Hagemann et al., 2010). Já outros auto-

**Tabela 2.** Comparação entre as características das pacientes que realizaram o assisted hatching que engravidaram versus as pacientes que não engravidaram

	Gravidez	Não gravidez	P – valor
Idade (em anos) (média ± DP)	38 ± 2,09	38 ± 2,16	0,97
Tempo (em anos) (média ± DP)	3,63 ± 2,63	3,93 ± 2,78	0,74
FSH em UI/mL (média ± DP)	8,27 ± 3,09	9,79 ± 3,53	0,14
Número de ciclos prévios (média ± DP)	0,70 ± 1,15	1,35 ± 1,87	0,15
Folículos antrais (média ± DP)	10,73 ± 5,24	10,21 ± 3,43	0,94
Número ampolas hMG (média ± DP)	48,91 ± 10,84	47,78 ± 11,85	0,47
Tempo de estimulação (em dias) (média ± DP)	10,91 ± 1,34	10,67 ± 1,39	0,17
Número de folículos (média ± DP)	7,09 ± 4,50	8,88 ± 6,53	0,29
Número de oócitos (média ± DP)	7,52 ± 4,68	9,28 ± 7,17	0,54
Número de MII (média ± DP)	5,41 ± 2,84	7,25 ± 5,90	0,63
Número de 2PN	5,41 ± 2,84	7,25 ± 5,90	0,85
Taxa de oócitos maduros	81%	79%	0,51
Taxa de fertilização	74%	75%	0,46
Taxa de clivagem	96%	97%	0,42
Porcentagem de bons embriões no dia 3	75%	82%	0,32
Número de embriões transferidos (média ± DP)	2,52 ± 0,59	2,50 ± 0,72	0,87

**Tabela 3.** Tipo de protocolo de estimulação ovariana

Hatching	Protocolo			χ <sup>2</sup>	P-valor
	antagonista	Longo	micro-flare		
Não	36 (21%)	84 (50%)	49 (29%)	4,74	0,09
Sim	8 (13%)	28 (44%)	27 (43%)		

res relatam uma maior incidência de gestação múltipla, principalmente gestação monozigótica com a realização do AH (Schieve et al., 2000).

Por se tratar de um estudo retrospectivo, não podemos estabelecer uma associação de causa-efeito entre o AH e melhora na taxa de implantação e de gravidez. No entanto, podemos concluir que as pacientes que realizaram o AH eram pacientes de pior prognóstico para a gravidez e mesmo assim obtiveram uma taxa de implantação e de gravidez semelhantes às das pacientes do grupo controle.

#### Endereço para Correspondência:

Rua Alvarenga Peixoto, 1329 Santo Agostinho BH - MG  
Tel: (31) 3292 - 5299  
e-mail: anamarcia.cota@procriar.com.br

#### Referências Bibliográficas

Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Hum Reprod.* 2002;17:1239–43.

Cohen J, Alikani M, Trowbridge J et al. Implantation enhancement by selected assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod.* 1992;7:685–69.

Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, et al. Impairment of the hatching process following in vitro fertilization in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod.* 1990;5:7–13.

Das Sangeeta, Blake Debbie, Farquhar Cindy, Seif Mourad MW. Assisted hatching on assisted conception (IVF and ICSI). *Cochrane Database of Systematic Reviews.* In: *The Cochrane*

*Library.* Issue 4, Art. No. CD001894. DOI: 10.1002/14651858.CD001894.pub4.

Edi-Osagie E, Hooper L, Seif MW. The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception: a systematic review. *Hum Reprod.* 2003;18:1828-1835.

Feng HL, Hershlag A, Scholl GM, Cohen MA. A retrospective study comparing three different assisted hatching techniques. *Fertil Steril.* 2009;91:1323-1325.

Hagemann AR, Lanzendorf SE, Jungheim ES, Chang AS, Ratts VS, Odem RR. A prospective, randomized, double-blinded study of assisted hatching in women younger than 38 years undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2010;93:586-591.

Hershlag A, Paine T, Cooper GW, Scholl GM, Rawlinson K, Kvapil G. Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil Steril.* 1999;71:144–6.

Ma S, Rowe T, Ho Yuen B. 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.

Martins WP, Rocha IA, Nastri CO, Ferriani RA. Assisted hatching em reprodução assistida: uma meta-análise de ensaios clínicos controlados. *Femina.* 2010;38:493-500.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992;340:17–8.

Schieve LA, Meikle SF, Peterson HB, Jeng G, Burnett NM, Wilcox LS. Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through in vitro fertilization? *Fertil Steril.* 2000;74:288–94.

Selva J. Assisted hatching. *Hum Reprod.* 2000;15:65-67.

The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The role of assisted hatching in in vitro fertilization: A review of the literature. A Committee opinion. *Fertil Steril.* 2008;90:S196-S198.

Zaninovic N. Assisted hatching and fragment removal. In: Veck LL, ed. *Human gametes and conceptuses.* Lancaster: Parthenon Pub Group Inc., 1998:86–96.