

Actitud ante fallos de FIV e ICSI

Attitude in IVF and ICSI failure

Expósito A, Castilla J A, Suárez I, Expósito A I, Luceño F, Núñez AI, Fontes J, Mendoza N, Martínez L.

Unidad de Reproducción, H.U. "Virgen de las Nieves", Granada. España.

Resumen

Analizar distintas opciones en parejas que no han conseguido gestación tras la aplicación de técnicas de reproducción asistida. Revisamos algunos factores involucrados en el fallo de fertilización después de una FIV convencional. Conocemos la eficacia de la microinyección espermática, sin embargo en pacientes con bajas respuestas después de la estimulación ovárica o con pobre calidad ovocitaria, la ICSI no está justificada y no se consiguen mejores resultados que después de una FIV convencional.

Palabras clave: Fallo. Tasa de fertilización. FIV. ICSI.

Summary

To analyse different options in couples with no pregnancy after assisted reproduction technologies. We will review some factors involved in fertilization failure after conventional IVF. It knows the efficacy of ICSI, however in patients with low responses after ovarian stimulation or with poor oocyte quality, ICSI is not justified and it does not improve the results after conventional IVF.

Key words: Failure. Fertilization rate. IFV. ICSI.

Correspondencia: Antonia Expósito Navarro
Unidad de Reproducción
Hospital Materno-Infantil
Avd. Fuerzas Armadas s/n
18014 Granada

No podemos definir una causa como única ante un fallo de fecundación in vitro, sí como principal o desencadenante de otras muchas, ya que de alguna manera, constituyen una miscelánea de variables que al final acaba en la ausencia de gestación. Como posibles causas de fallos en el éxito de FIV/ICSI podemos citar las de la Figura 1.

Una vez vistas las posibles causas que van a dar lugar a fallos en la fecundación totales o parciales con las distintas técnicas de reproducción asistida (FIV o ICSI), debemos plantearnos que hacer cuando a una paciente se le han realizado distintos ciclos y no se ha conseguido gestación.

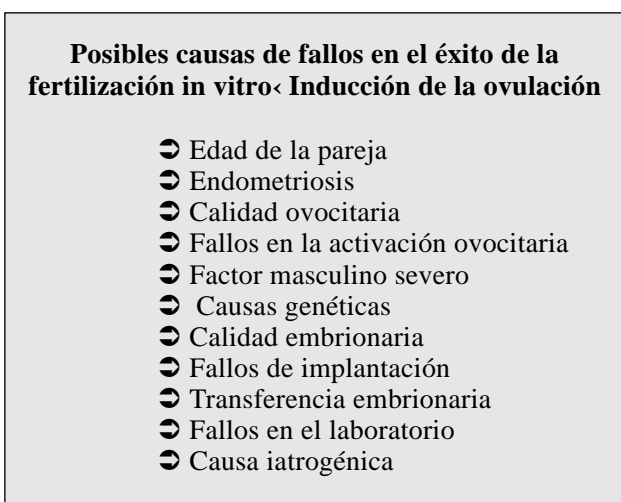


Figura 1

Fallos en el éxito de la Fecundación in vitro

I. ACTITUD ANTE FALLOS DE FIV

I.1. Por no fecundación

1.1.1. Reinseminación: Aproximadamente el 10% de las pacientes sometidas a FIV sufren un fallo de fecundación (1). La reinseminación de estos ovocitos, sin signo de fecundación se propone como alternativa ante un fallo de fecundación, encontrando en la literatura tasas de fecundación por FIV que ronda el 36% y tasa de fecundación por ICSI entre el 60-70% (2-5). Sin embargo, estos buenos resultados van acompañados de un alto grado de polispermia en los ovocitos reinseminados, de embriones con pobre calidad y nulo potencial de implantación (6-9). Por tanto, hoy día pocos grupos utilizan este procedimiento.

Una vez descartada la reinseminación como hemos visto, tras un ciclo de FIV con fallo de fecunda-

ción se han propuesto diferentes posibilidades para el siguiente ciclo dependiendo de la indicación por la cuál se hizo la FIV.

1.1.2. Por ESCA

En caso de encontrar parejas con una esterilidad sin causa (ESCA) y un ciclo previo sin fecundación o menos del 20% de ovocitos fecundados, algunos autores recomiendan la realización de otro ciclo de FIV clásica ya que el fallo completo de fecundación en un primer ciclo no necesariamente debe persistir durante el siguiente ciclo (10) habiéndose obtenido con este protocolo tasas de fecundación del 44% (11).

También se ha propuesto realizar un ciclo de FIV utilizando una mayor concentración espermática en la inseminación (12-13) obteniendo tasas de fecundación alrededor del 36%. Por otra parte, ante un fallo de FIV clásica, algunos autores (14-17) han realizado un estudio sobre la incidencia de anomalías en ovocitos, relacionando las aberraciones cromosómicas maternas con la reducción de la tasa de fecundación (18-20), proponiendo en estos casos la donación de ovocitos.

Por último, en distintos trabajos (21-25) encontramos que la mejor opción es la realización de un ciclo de ICSI, pues la práctica de un nuevo ciclo de FIV convencional resulta en tasas de fecundación no superiores al 20% (10, 26-27) y la realización de una ICSI, en este grupo de pacientes, reduce considerablemente el riesgo de un nuevo fallo de fecundación y permite obtener tasas de fecundación superiores al 70% (2). Como vemos, las mayores tasas de fecundación tras fallo de fecundación en un ciclo de FIV se consigue en un segundo ciclo de ICSI, no obstante dada que la tasa de fecundación en FIV no es baja (\approx 45%), algunos autores (27-28) consideran que en caso de tener un número suficiente de ovocitos debería realizarse un ciclo mixto (FIV/ICSI).

1.1.3. Factor masculino:

En caso de encontrar una pareja con factor masculino y un ciclo previo de FIV sin fecundación son varias las alternativas propuestas. En primer lugar, repetir otro ciclo de FIV aduciendo que el fallo anterior se debe a causas temporales (28). También se propone el tratamiento médico del varón antes del segundo ciclo de FIV clásico (29-30) con FSH, aumentando la concentración espermática en más del doble respecto a el grupo control, siendo el porcentaje medio de fecundación del 20% en comparación con un 5,8% que presentó el grupo control. También se propone como alternativa el repetir otro ciclo de FIV pero utilizando

una mayor concentración espermática (2, 31) aunque los resultados obtenidos en las tasas de fecundación por los distintos grupos son divergentes. La realización de ciclos mixtos podría ser una alternativa aceptable (27-28) cuando nos enfrentemos a otro ciclo. Sin embargo, el tratamiento de elección más aceptado sería la realización de un ciclo de ICSI (3, 26, 32) ya que las tasas de fecundación obtenidas alcanzan valores entre 50% y 75%.

1.1.4. Otros Factores

Independientemente de la alternativa que hayamos tomado para el siguiente ciclo tras fallo de fecundación debemos tener en cuenta varios puntos: factores iatrogénicos, actitud ante pobres respuestas y factor de laboratorio. En cuanto al primero se ha descubierto la interferencia de la ingesta de bloqueadores de canales de calcio (nifedipina) con el proceso de fecundación. Así, se ha comunicado en un estudio realizado por Benoff et al. (33) en un pareja con ESCA donde se produjo un fallo en la fecundación sin causa aparente. Al revisar el historial médico del paciente encuentran que estaba bajo tratamiento por hipertensión con nifedipina, lo que se traducía en una translocación de los receptores de ligando de manosa en la cabeza espermática. Por tanto, recomienda buscar medicamentos alternativos que no afecten la actividad de los canales de calcio, tipo verapamil, al menos tres meses antes de la realización de la FIV. Estos resultados fueron corroborados por Herslag et al. (34) donde analizan la infertilidad de un paciente tratado con nifedipina por hipertensión, que después de dejar el tratamiento se produjo la normalización tanto de los receptores de manosa como de la reacción acrosómica dando lugar a un embarazo.

Un punto importante a la hora de considerar un fallo de FIV es el número de ovocitos utilizados, ya que podríamos pensar que el fallo de FIV se produce por tener muy pocos ovocitos, por lo que la realización de una ICSI hubiese sido lo mejor para asegurarnos la fecundación. No obstante, son numerosos los trabajos (35-36) que demuestran que la tasa de gestación en ciclos donde se obtienen menos de 3 ovocitos es igual si se realiza tanto una FIV como una ICSI, por lo que creemos que este factor no debe limitarnos en la toma de decisiones posteriores. Creemos igualmente interesante comentar en este punto la actitud a tomar ante ciclos de FIV con pobre respuesta, pues se plantea la duda de si cancelar o puncionar.

Encontramos distintos trabajos (27, 36-37) que deciden, ante una pobre respuesta (≤ 5) continuar con el ciclo de FIV como la mejor opción antes de cance-

lar. En el estudio realizado por Lashen et al. (38) las pacientes seleccionadas debían contar en el día 3 del ciclo con una FSH normal y con menos de 5 folículos, clasificándose en tres grupos A, B y C dependiendo si el número de ovocitos era de 1 ó 2, de 3 o de 4, respectivamente. Encontrando que la tasa clínica de embarazo/ciclo en los tres grupos fue comparable a la obtenida en respondedoras normales (25,5%). En esta línea tenemos el trabajo reciente presentado por Biljan et al. (37) donde nos muestran los resultados obtenidos con pacientes < 40 años y ≥ 40 años con > 3 ó ≤ 3 ovocitos. Aunque la tasa de fecundación y de implantación no difieren entre los dos grupos de pacientes, la mala calidad ovocitaria en pacientes con edades superiores a 40 años hace que el porcentaje de transferencias que finalizan en gestación sea menor. Los resultados nos llevan a pensar que pacientes < 40 años deben continuar con el ciclo de FIV a pesar del pobre reclutamiento folicular. En pacientes mayores la relación edad-pobre calidad ovocitaria compromete el éxito del tratamiento, por tanto la cancelación del ciclo sería la actuación más apropiada. No se recomienda cambiar la indicación de FIV a ICSI por el hecho de tener una pobre respuesta, ya que no incrementa el porcentaje de embarazos.

Por último, son diferentes los aspectos del laboratorio que hay que considerar ante un fallo de fecundación por FIV como: el control del CO₂, los niveles de compuestos orgánicos volátiles (VOC), instalación de filtros, etc.

Resulta crucial, para cualquier programa de fecundación in vitro que la incubadora de CO₂ esté correctamente regulada y calibrada, manteniendo un medio con bicarbonato y CO₂ al 5% en la incubadora o bien una atmósfera que contenga un 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, ya que distintas concentraciones de bicarbonato y CO₂ alterarían de forma importante el pH con el consiguiente efecto deletéreo para el material biológico, así como libre de contaminación por cualquier patógeno (39-40).

Se ha comenzado a dar importancia a los factores ambientales y microambientales y su posible influencia sobre ovocitos y embriones. Los niveles de los distintos compuestos orgánicos volátiles (VOC) repercuten en el embrión, afectando al metabolismo y la secreción, quizás por modificación de las transcripción del RNA (9). Está demostrada que el nivel de compuestos orgánicos volátiles en el interior de un laboratorio de FIV es mayor que en el ambiente exterior. A esto, debe añadirse los productos derivados de sustancias que habitualmente se utilizan en el laboratorio: alcohol utilizado para la desinfección que da

lugar a grandes cantidades de isopropanol así como el material de plástico que desprende sus monómeros, incluso los gases (freones) utilizados en frigoríficos y otros sistemas de refrigeración. Aunque no se conoce con certeza el modo de actuación y la influencia concreta de cada una de éstas sustancias, la instalación de filtros para el aire que disminuya esta contaminación química ha demostrado aumentos significativos en las tasas de implantación del embrión (41).

En un trabajo realizado por Cohen et al. (42) sobre cultivo y control de calidad de embriones, analiza los posibles factores medioambientales que repercuten negativamente en sus resultados. Tras la aparición de una plaga de coccinella la administración decidió ponerle fin utilizando pesticidas en los alrededores del centro de investigación. Para la exterminación total se necesitó tres ciclos de fumigación que coincidieron, cada uno de ellos, con una disminución significativa de los índices de implantación, sin embargo el desarrollo y la fecundación in vitro eran normales.

I.2. Por no implantación

Parece claro que la actitud a tomar tras un ciclo de FIV con fallo de implantación, es la repetición de un nuevo ciclo de FIV. La cuestión ahora es ¿cuántas veces intentarlo?.

La tasa de embarazo (PR), en general, por transferencia en ciclo de FIV oscila entre el 16-35% por transferencia embrionaria (ET) (43). En la literatura encontramos distintos trabajos (44-46) donde la probabilidad de embarazo clínico por ciclo oscila entre el 15%-25%, con una probabilidad acumulada, cuando se realizan 3, 5 y 7 ciclos, de 57%, 75% y 97%, respectivamente.

Sin embargo, no todos los autores (10, 47-48) están de acuerdo con lo anterior ya que la probabilidad de éxito en ciclos sucesivos de FIV disminuye después del tercer ciclo. Un factor determinante con el número de ciclos a realizar tras fallos de implantación será la edad de los cónyuges, ya que a partir de los 30 años comienza una lenta y progresiva disminución de la fertilidad, disminuyendo ésta rápidamente a partir de los 40 años (49).

Esta disminución de la fertilidad está relacionada con alteraciones de la ovulación, alteraciones en el ovocito (cromosómicas o no), disminución de la receptividad endometrial, aumento de la frecuencia de alteraciones ginecológicas y no ginecológicas, etc... Todos estos factores conducen a una disminución de la respuesta ovárica a la estimulación, menor número de ovocitos captados, disminución de la calidad ovocitaria que junto con una menor tasa de fecundación

da lugar a un número reducido de embriones y a menores tasas de implantación con la obtención de un número bajo de embarazos. A partir de los 40 años, este número de embarazos termina en aborto con una frecuencia casi dos veces superior a la encontrada antes de esta edad. Aunque la edad paterna no ha sido cuestionada en el fracaso de la técnica de reproducción (50), últimamente la edad del hombre está siendo valorada y en un estudio reciente presentado por Ford et al. (49) señala que los riesgos de abortos y anomalías genéticas en recién nacidos se incrementa con la edad del padre (51-52).

Con la intención de aumentar las tasas de embarazos se han propuesto varias técnicas de laboratorio en embriones de mujeres con fallos repetidos de implantación:

Eclosión Asistida o "Hatching": basado en que los fallos de implantación también pueden deberse a la incapacidad del blastocisto a abandonar la zona pelúcida y así poder implantarse en el endometrio, necesitando ser ayudado para que la eclosión o hatching tenga lugar.

La mayoría de los trabajos existentes en la literatura sobre eclosión o hatching asistido, se realizan con parejas que han sido sometidas a ciclos de FIV clásica, habiendo fallado la transferencia embrionaria. A la hora de analizar estos trabajos sobre la eficacia del hatching, debemos tener en cuenta criterios de medicina basada en la evidencia, la cual nos indica que la evidencia de buena calidad, viene de metaanálisis o trabajos con diseños aleatorios y controlados con un elevado número de pacientes, en nuestro caso particular, se trataría por ejemplo, de parejas que tras tres ciclos con transferencia embrionaria se dividen aleatoriamente en dos grupos, uno al que se somete a un nuevo ciclo con Hatching y, otro grupo, que se somete a un nuevo ciclo con la técnica de FIV clásica. Las conclusiones obtenidas de investigaciones con diseños basados en controles históricos, por ejemplo, comparación de resultados durante unos años sin hatching asistido y a partir de una fecha con hatching, o con diseños sin grupo control, en nuestro caso a una cohorte de parejas que tras tres ciclos fallidos de transferencias, se les realiza otro ciclo aplicando hatching y se comparan las tasas de embarazos, aportan evidencias de una calidad regular (53). En este último caso, podría darse el fenómeno descrito por Stolwijk et al. (54) de repetir ciclo a las parejas con mayor probabilidad de éxito o el fenómeno inverso de tener una menor probabilidad de gestación, conforme aumenta el número de ciclos (21,23).

En un estudio llevado a cabo en la Universidad Nacional de Taiwán (55), los resultados demuestran

que la tasa de embarazo en pacientes con fallos repetidos de FIV, tras someterse a hatching asistido, es significativamente alta comparada a la tasa de embarazos de pacientes con fallo de FIV pero que no se sometieron a hatching asistido (42,2% frente a 16,1%). Estos resultados beneficiosos con hatching asistido en pacientes con FIV fallidas repetidamente, son corroborados por otros estudios (56-57) planteados también con grupos de pacientes sometidos a hatching asistido y grupos control que no se sometieron a la técnica. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos, se indica el método de aleatorización, ni realizan consideraciones sobre el tamaño de muestra, de hecho, todos estos trabajos se basan en estudios con un bajo número de casos. Por todo esto debemos concluir, que son necesarios estudios aleatorios con grupos control y mayor número de casos antes de recomendar esta técnica tras fallos repetidos de implantación.

Transferencia de blastocistos: mediante la utilización de cocultivos y los nuevos medios secuenciales (58-60). Gracias a la introducción de estas técnicas en los laboratorios de reproducción, hoy en día, se puede conseguir que el embrión humano alcance el estadio de blastocisto, permitiendo de éste modo una selección óptima de los embriones con mayor capacidad para implantar. Pero, a pesar de las mejoras realizadas, no todos los embriones se ven beneficiados con técnicas de cultivo prolongado, ya que pacientes de FIV con pocos número de embriones no estaría indicada esta técnica puesto que la probabilidad de un embrión normal de llegar a blastocisto es aproximadamente del 50% (61) con el consiguiente riesgo que esto conlleva. Todo lo comentado para el hatching es aplicable a la multitud de trabajos sobre transferencia de blastocisto en parejas con fallo repetidos de implantación (62) por lo que consideramos necesario igualmente estudios aleatorios con grupos controles y con un mayor número de individuos.

Estudio de citogenética mediante técnica de diagnóstico genético preimplantacional (DGP): la cuestión a plantear sería si el DGP ayudaría a mejorar los resultados de las técnicas de reproducción en general. Gianaroli et al. (63-64) proponen realizar DGP a todas las pacientes de edad, a las que cuentan con múltiples fallos previos, portadoras de traslocaciones u otras alteraciones cromosómicas en su cariotipo. Los resultados de su estudio muestran un incremento de la tasa de embarazos en mujeres con fallos repetidos de implantación sometidas a la técnica respecto al grupo control (24,2 % versus 12,4%). Igualmente se benefician de la aplicación del DGP las pacientes > 42 años obteniendo una tasa de embarazo del 40,1% frente al

11,1% del grupo control. A pesar de los buenos resultados obtenidos en este subgrupo de pacientes, no estaría indicado en pacientes que cuenten con pocos ovocitos, por el riesgo que se corre al aplicar la técnica (65)

Donación de ovocitos: la donación de ovocitos es una técnica de eficacia probada en mujeres mayores, en mujeres con insuficiencia ovárica y en fallos repetidos de implantación en ciclos de FIV repetidos (25). Con la donación de ovocitos se consigue una tasa de nacimiento de aproximadamente el 40-50% por ciclo, pudiendo llegar la tasa de nacimiento acumulada al 90% con 4 ciclos o más (66).

Donación de citoplasma: utilizándose cuando se sospecha de un deficiencia citoplasmática ovocitaria y no nuclear, aumentando la viabilidad de los embriones. Con la transferencia de citoplasma aportamos factores de crecimiento, RNAm, ATP, mitocondrias, etc., pudiendo mejorar las deficiencias del citoplasma ovocitario influyendo en la calidad embrionaria (67). En los resultados generales publicados por Calderón et al. (3) sobre la transferencia citoplasmática en ovocitos humanos maduros encuentran diferencias significativas al comparar las tasas de embarazo clínico e implantación embrionaria entre los dos grupos de tratamiento. Las tasas de embarazo clínico e implantación en el grupo control con fallo de FIV previo se situaron en el 3,1% y 1% respectivamente y en el grupo de transferencia de citoplasma fueron del 52% y 18.% ($p < 0,0001$). A pesar de estos alentadores datos no debemos olvidar que se trata de un técnica experimental y todavía queda por saber las posibles consecuencias de transferir las mitocondrias del ovocitos de la donadora en la receptora ya que los posibles efectos de la mezcla de los dos tipos de mitocondrias está todavía en discusión (68).

En esta línea se sigue investigando y resultados similares se han obtenido con la utilización de otra técnica experimental al realizar la inyección conjunta del citoplasma procedente de un cigoto triploide con un espermatozoide de la pareja en un ovocito en MII de la paciente (69).

II. FALLOS EN CICLOS DE ICSI

II.1. Por no fecundación

En un análisis realizado por Lui et al. (32) estudian 2732 ciclos de ICSI encontrando que en 76 ciclos (72 parejas) de ICSI se habían producido un fallo total de fecundación (3%). De las 72 parejas, 26 realizaron un nuevo ciclo de ICSI consiguiendo fecundación 22 de ellas y tan sólo 4 parejas no obtienen ovo-

citó fertilizados ya que 3 de ellas están diagnosticadas de globozoospermia y una se catalogó como fallo idiopático. Por tanto, concluyen que la mayoría de las parejas con fallo total de fecundación en un ciclo de ICSI pueden alcanzar fecundación en subsiguientes ciclos de ICSI.

II.1.1 Factor masculino severo: la ICSI es el tratamiento de elección en caso de oligozoospermias severas o criptoospermia, astenoospermia y teratoospermia severa o la combinación de ellas (OAT) al igual que en casos de autoinmunidad espermática y en azoospermias (obstructivas o secretoras).

En pacientes con criptoospermia (70) y astenoospermia absolutas (59, 71) se han publicado tasas de fecundación en ICSI del 66% y 26% respectivamente. Esta baja fecundidad, en el caso de astenoospermia absolutas, parece estar relacionada con la vitalidad y no con la inmovilidad espermática, pudiendo optar por la selección de espermatozoides a microinyectar mediante el test hipoosmótico o realizar una biopsia testicular en busca de espermatozoides vivos, ya que los resultados de ICSI cuando se realizan con espermatozoides testiculares son mejores que con espermatozoides inmóviles del eyaculado en estos pacientes(72-73)

II.2. Por no implantación:

Cuando realizamos ICSI, después de dos intentos, se observa una disminución de la tasa de embarazo después del segundo intento sin éxito (35,9% vs 20,7%) (74). En pacientes > 37 años se propone realizar hasta 4 ciclos de ICSI ya que la probabilidad acumulada de embarazo por ciclo va aumentando, pasando del 11% en el primer intento al 16% en el cuarto, a partir del cual no se consigue aumentar la esta tasa,

sin embargo este estudio necesita confirmación ya que cuenta con un número muy pequeño de pacientes (75)

Por tanto, tras tres ciclos de ICSI sin implantación se propone el realizar un nuevo ciclo pero con el apoyo que supone el realizar cocultivo, hatching, DGP (ver apartado de FIV).

II.3. Factor laboratorio:

La importancia de la cualificación del personal de laboratorio en el resultado de la ICSI, queda patente en los resultados publicados por Bergens-Janssen et al. (76) cuando quisieron contratar un experto especialista en ICSI pero no antes de pasar por una dura prueba. Para ello pusieron a prueba a cuatro especialistas con el mismo adiestramiento y técnica y analizaron parámetros como la incidencia de ovocitos dañados, el índice de fecundación normal (la obtención de 2PN), índice de fecundación anormal (obtención de 1PN y >2PN) y desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (Tabla1).

Como se aprecia en la tabla se observan diferencias significativas en la tasa de ovocitos fertilizados anormalmente y el desarrollo hasta blastocisto, por tanto los resultados de la inyección espermática pueden reflejar las diferencias de la habilidad del personal de laboratorio. Esto nos debe obligar a realizar controles de calidad tanto internos como externos, promover y unificar protocolos en los laboratorios de embriología, contar con guías prácticas que cubran aspectos como la organización, personal técnico, destrezas, equipamiento y seguridad, todo lo necesario para una buena práctica de laboratorio (77-78).

A modo de resumen, la opción recomendada ante un fallo de FIV/ICSI debería ser la expuesta en las Tablas 2 y 3.

Tabla 1

Técnico	Nº ovocitos inyectados	Ovocitos dañados (%)	IPN (%)	2 PN (%)	> 2PN (%)	Blastocistos
1	376	4,3 ¹	7,7 ¹	64,9 ¹	2,9 ^{1,2}	17,2 ¹
2	565	5,7 ¹	9,4 ¹	66,2 ¹	2,8 ^{1,2}	22,2 ^{1,2}
3	440	5,4 ¹	5,4 ¹	64,9 ¹	0,9 ¹	14,7 ¹
4	297	7,7 ¹	7,7 ¹	63,0 ¹	4,7 ²	30,2 ²

(subíndice distintos dentro de la misma columna presentan diferencias significativas (Anova, Tukey, P<0,01)).

Tabla 2

FALLO DE FIV	SIGUIENTE CICLO
<i>Por no fertilización</i>	
Indicación de FIV por ESCA	MIXTA o ICSI
Indicación de FIV por FM	ICSI
<i>Por no implantación</i>	Repetir FIV

Tabla 3

FALLO DE ICSI	PROPUESTA
Por no fertilización	ICSI (<2 fallos realizar estudio)
Por no implantación	Repetir ICSI

BIBLIOGRAFÍA

- Aboujaoude I, Boulos J, Hachem F et al.:** Normal spermatozoa: IVF or ICSI?. Abstracts of the 15th Annual Meeting of the ESHRE, 1999 e, Tours, Franc.
- Payne D, Flaherty SP, Jeffrey R et al.:** Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod, 1994, 9: 2051-57.
- Calderón G, Belil L, Aran B et al.:** Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in vitro fertilization: first results. Hum. Reprod, 1995, 10: 2835-2839.
- Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI et al.:** Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization for sibling oocytes in cases of unexplained infertility and borderline semen. J. Assis. Reprod. Genet, 1996a, 13: 38-42.
- Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI et al.:** Prospective controlled randomised study of in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in the treatment of tubal factor infertility with normal semen parameters. Fertil. Steril, 1996a, 66: 753-56.
- Pampiglione JS, Mills C, Campbell S et al.:** The clinical outcome of reinsemination of human oocytes fertilised in vitro. Fertile. Steril, 1990, 53, 306-10.
- Cho S, Piccinni O, Baldini D, et al.:** May intracytoplasmic sperm injection rescue failed in vitro fertilization cycles?. ASRM Annual Meetings, 1996.
- Minaretzis D, Meimeti-Damianaki T, Georgiou C, et al.:** Fertilization rate and implantation potential of aged oocytes following reinsemination with new homologous sperm, heterologous sperm or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in failed fertilization cycles. ASRM Annual Meetings, 1996.
- Van Kooij RJ.:** Safety in the IVF laboratory. Abstracts of the 15th Annual meeting of the ESHRE, 1999, Tours, France.
- Lipitz S, Rabinovici J, Ben-Shlomo I et al.:** Complete failure of fertilization in couples with unexplained infertility: Implications for subsequent in vitro fertilization cycles. Fertile. Steril, 1993, 59: 348-52.
- Matthews S, Lavender B, Margara R et al.:** Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization with normal semen parameters: outcome is no better with ICSI in cycles with previous poor fertilization. Abstracts of the 15th Annual Meeting of the ESHRE, Tours, France, 1999.
- Fishel SB, Lisis F, Rinaldi L et al.:** High insemination concentration (HIC) versus ICSI for conception in vitro. Reprod. Fertil. Dev, 1995, 7: 169-175.
- Morton PC, Yoder CS, Tucker MJ, et al.:** Reinsemination by intracytoplasmic sperm injection of 1 day old oocytes after complete conventional fertilization failure. Fertil. Steril, 1997, 68, 499-91.
- Speed RM.:** Prophase pairing in a mosaic 18p-; iso 18p human female fetus studied by surface spreading. Hum. Genet, 1986a, 72: 256-9.
- Speed RM.:** Oocyte development in XO fetuses of man and mouse: the possible role of heterologous X-chromosome pairing in germ cell survival. Chromosoma, 1986b, 94: 115-124.
- Mau UA, Bockert IT, Kaiser P et al.:** Chromosomal finding in 150 couples referred for genetic counselling prior to intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod, 1997, 12: 930-937.
- Plachot M.:** The human oocyte. Genetic aspects. Ann. Genet, 1997, 40: 115-120.
- Mittwoch U, Mahadevajah SK and Setterfield SA.:** Pachytene pairing and oocyte numbers in mice with two single Robertsonian translocations and the male-sterile compound with monobrachial homology. Cytogenet. Cell. Genet, 1990, 53: 144-147.
- Meschede D, DeGeyter C, Nieschlag E et al.:** Genetic risk in micromanipulative assisted reproduction. Hum. Reprod, 1995, 10: 2880-288.
- Van der Ven K, Peschka B, Montag M et al.:** Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod, 1998, 13: 48-54.
- Hershlag A, Kaplan EH, Loy RH et al.:** Heterogeneity in patient populations explains differences in in vitro fertilization programs. Fertile. Steril, 1991, 56: 913-17.
- Haan G, Bernardus RE, Hollanders JMG et al.:** Results of IVF from a prospective multicenter study. Hum. Reprod, 1991, 6:805-10.
- Tan S, Royston P, Campbell S, et al.:** Cumulative conception and livebirth rates after in-vitro fertilization. Lancet, 1992, 339:1390-94.

24. **Yovel I, Geva E, Lessing JB et al.:** Analysis of the fourth to the eight in vitro fertilization treatments after three previously failed attempts. *Hum. Reprod*, 1994, 9: 738-41.
25. **Meldrum D, Wisot A, Yee B, et al.:** 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*, 1998, *Genet.* 15: 418-21.
26. **Kastrop PMM, Weima SM, Van Kooij RJ et al.:** Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization (IVF) with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt. *Hum. Reprod*, 1999, 14, 65-69.
27. **Fishel S, Aslam I, Lisi F, et al.:** Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in vitro conception? *Hum. Reprod*, 2000, 15, 1278-1283.
28. **Glich M, Brodén H, Lundin K, et al.:** What should the criteria for utilizing ICSI be?, 1998
29. **Foresta C, Bettella A, Ferlin A et al.:** Evidence for a stimulatory role of follicle-stimulating hormone on the spermatogonial population in adult males. *Fertil. Steril*, 1998, 69: 636-42.
30. **Ben-Rafael Z, Farhi J, Feldberg D et al.:** Follicle-stimulating hormone treatment for men with idiopathic oligoteratoasthenozoospermia before in vitro fertilization: the impact on sperm microstructure and fertilization potential. *Fertil. Steril*, 2000, 73: 24-30.
31. **Hall J, Fishel S, Green S et al.:** Intracytoplasmic sperm injection versus high insemination concentration in vitro fertilization in cases of very severe teratozoospermia. *Hum Reprod*, 1995, 10: 493-96.
32. **Lui J, Nagyz Z, Joris H et al.:** Análisis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum. Reprod.*, 1995, 10, 2630-2636.
33. **Benoff S, Cooper GW, Hurley I et al.:** The effect of calcium ion channel blockers on sperm fertilization potential. *Fertile. Steril*, 1994, 62: 606-17.
34. **Hershlag A, Cooper GW and Benoff S.:** Pregnancy following discontinuation of a calcium channel blocker in the male partner. *Hum. Reprod*, 1995, 10:599.
35. **Moreno C, Ruíz A, Simón C et al.:** Intracytoplasmic sperm injection as a routine indication in low responder patients. *Hum. Reprod*, 1998, 13: 2126-9.
36. **Lassa A, Croucher C, Duffy S et al.:** One thousand initiated cycles of in vitro fertilization in women > 40 years or age. *Fertile. Steril*, 1998, 70: 1030-40.
37. **Biljan MM, Buckett WM, Dean N, et al.:** The outcome of IVF embryo transfer treatment in patients who develop three follicles or less. *Hum. Reprod*, 2000, 15, 2140-44.
38. **Lashen H, Ledger W, López-Bernal et al.:** Poor responders to ovulation induction: is proceeding to in vitro fertilization worthwhile?. *Hum. Reprod*, 1999, 14: 964-9.
39. **Umbreit WW.:** Carbon dioxide and bicarbonate. En: Umbreit WW, Burris RH, Stauffer JF (eds). *Manometric Techniques*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1957, cap 2, pp 18-27.
40. **Bowman P and Maclaren A.:** Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. *J. Embryol. Exp. Morph*, 1970, 23: 693-704.
41. **Boone WR, Johnson JE, Locke et al.:** Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertile. Steril*, 1999, 71:150-54.
42. **Cohen J, Guilligan A and Willadsen S.:** Culture and quality control of embryos. *Hum. Reprod*, 1998, 3:137-144.
43. **Seppala M.:** The world collaborative on in vitro fertilization and embryo replacement: Current state of the art in January 1984. *Ann. NY Acad Sci*, 1985, 442:558-563.
44. **Wilkes CA, Rosenwaks Z, Jones DL, et al.:** Pregnancy related to infertility diagnosis, number of attempts and age in a program of in vitro fertilization. *Obstet. Gynecol*, 1985, 66: 350-352.
45. **Guzick DS, Wilkes C, Jones HW.:** Cumulative pregnancy rates for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 1986, 46: 663-667.
46. **Padilla SA and García JE.:** Effect of maternal age and number of in vitro fertilization procedures on pregnancy outcome. *Fertile. Steril*, 1989, 52: 270-273.
47. **Geva E and Amit A.:** IVF treatment after successive Failed Attempts: What next?. *Assit. Repro. reviews*, 1994, 4:150-4.
48. **Kadar N, Bohrer H, Hemmann E et al.:** The discriminatory human chorionic gonadotropin zone for endovaginal sonography: a prospective, randomized study. *Fertil. Steril*, 1994, 61: 1016.
49. **Ford WC, North K, Taylor H et al.:** Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. *Hum. Reprod*, 2000, 15: 1703-08.
50. **Mortimer D, Curtis EF, Miller RF.:** Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J. Reprod. Fertile*, 1987, 81: 127-135.
51. **Lansac J.:** Is delayed childbearing a good thing?. *Hum. Reprod*, 1995, 10: 1033-1035.
52. **Tarín JJ, Brines J and Cano A.:** Long-term effects of delayed parenthood. *Hum. Reprod*, 1998, 13: 2371-76.
53. **Suárez I, Expósito A, Expósito AI, et al.:** ¿Qué queda de la moda de Hatching asistido? *Asebir*, 2000, 5:14-18.
54. **Stolwijk AM, Hamilton CJ, Hollanders JM.:** A more realistic approach to the cumulative pregnancy rate

- after in vitro fertilization. *Hum. Reprod*, 1996, 11: 660-63.
55. **Chao K, Chen S, Chen H et al.:** 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.
 56. **Cohen J, Alikani M, Trowbridge J et al.:** Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum. Reprod*, 1992, 7: 685-91.
 57. **Mahadevan MM, McIntosh Q, Miller MM et al.:** Formaldehyde in cryoprotectant propanediol and effect on mouse zygotes. *Hum. Reprod*, 1998, 9: 979-82.
 58. **Menezo YJ, Sakkas D and Janny L.:** Co-culture of the embryo: factors affecting human blastocyst formation in vitro. *Microsc. Res. Tech*, 1995, 32: 50-6.
 59. **Feng HL, Wen XH, Amet T, et al.:** Effect of different coculture systems in early human embryo development. *Hum. Reprod*, 1996, 11: 1525-1528.
 60. **Rubio C, Vidal F, Mínguez Y et al.:** Influencia de las anomalías cromosómicas en el desarrollo preimplantatorio de embriones humanos. *Rev. Iberoamericana de Fertilidad*, 2000, 12: 17-22.
 61. **Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L et al.:** A prospective randomised trial of blastocyst culture and transfer in in vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1998, 13: 3434-3440.
 62. **Plachot M.:** The blastocyst. *Hum. Reprod*, 2000, 15: 49-58.
 63. **Gianaroli L, Magli MC, Munné S et al.:** Does preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy?. *Hum. Reprod*, 1997, 12: 1762-67.
 64. **Gianaroli L, Magli MC, Ferreratti AP et al.:** Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil. Steril*, 1999, 72: 837-44.
 65. **Munné S, Dailey T, Sultan KM et al.:** The use of the first polar bodies for pre-implantation diagnoses of aneuploidy. *Mol. Hum. Reprod*, 1995, 10: 1014-1020.
 66. **Remohí J, Gartner B, Gallardo E et al.:** Pregnancy and birth rates after oocyte donation. *Fertil Steril*, 1997, 67: 717-723.
 67. **Flood JT, Chillik CF, Van Uem JF et al.:** Ooplasmic transfusion: prophase germinal vesicle oocyte made developmentally competent by microinjection of metaphase II egg cytoplasm. *Fertile Steril*, 1990, 53: 1049-54.
 68. **Lanzerdorf Se, Mayer JF, Toner J et al.:** Pregnancy following transfer of ooplasm from cryopreserved thawed donor oocytes into recipient oocytes. *Fertil. Steril*, 1999, 71: 575-577.
 69. **Zhang J, Wang CW, Krey L et al.:** In vitro maturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle transfer. *Fertil Steril*, 1999, 71: 726-31.
 70. **Gil-Salom M, Mínguez Y, Rubio C et al.:** Intracytoplasmic sperm injection: a treatment for extreme oligospermia. *J. Urol*, 1996, 156: 1001-4.
 71. **Nagy Z, Liu J, Janssenswillen C et al.:** Using ejaculated fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril*, 1995, 63: 808-815.
 72. **Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA et al.:** The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertile Steril*, 1996, 65: 972-76.
 73. **Tournaye H, Lui J, Nagyz et al.:** The use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in patients with necrozoospermia. *Fertil Steril*, 1996, 66: 331-334.
 74. **Stalf T, Herrero J, Turley H, et al.:** Cumulative pregnancy rate of patients with different numbers of IVF or ICSI treated cycles. *Hum. Reprod*. 13, Abstracts of the Annual Meeting of the ESHRE, 1999.
 75. **Osmanangaoglu K, Tournaye H, Vandervorst et al.:** Cumulative delivery rates after intracytoplasmic sperm injection in women older than 37 years. Abstracts of the 15th Annual meeting of the ESHre, Tours, France, 1999.
 76. **Bergers-Janssen JM, Dumoulin JCM, Bras M, et al.:** Outcome of injection procedure performed by different technicians in an ICSI programme. Abstracts of the 14th Annual meeting of the ESHRE, Göteborg, 1998.
 77. **Dawson KJ.:** Quality control in embryology laboratories. Abstracts of the 14th Annual meeting of the ESHRE, Göteborg, 1998.
 78. **Cooper TG.:** Quality control in andrology laboratories. Abstracts of the 14th Annual meeting of the ESHRE, Göteborg, 1998.