



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA AGN & ASOC.
HOSPITAL ANGELES DEL PEDREGAL

**“EFECTOS DEL FIV *VERSUS* ICSI, SOBRE LA CALIDAD Y
DESARROLLO EMBRIONARIO EN LOS OVOCITOS DE PAREJAS
CON FACTOR DE INFERTILIDAD MASCULINO LEVE”**

T E S I S

QUE PRESENTA LA:

**DRA. EVA HAYDEE OBREGÓN ZEGARRA
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN:
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

ASESORES:

**DR. ALFONSO JAVIER GUTIÉRREZ NÁJAR
DRA. MARÍA DEL SOCORRO BENAVIDES SALAZAR**



MÉXICO, D. F.

OCTUBRE 2006

Hospital Angeles



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

HOSPITAL ÁNGELES DEL PEDREGAL

**CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA AGN Y
ASOCIADOS**

**EFFECTOS DEL FIV CONVENCIONAL *VERSUS* ICSI, SOBRE
LA CALIDAD Y DESARROLLO EMBRIONARIO EN LOS
OVOCITOS DE PAREJAS CON FACTOR DE INFERTILIDAD
MASCULINO LEVE**

ASESORES:

**DR. ALFONSO GUTIÉRREZ NÁJAR
DIRECTOR DE LA CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN Y
GENÉTICA AGN Y ASOCIADOS
HOSPITAL ÁNGELES DEL PEDREGAL
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE BIOLOGÍA DE
LA REPRODUCCIÓN HUMANA.**

**DRA. MARIA DEL SOCORRO BENAVIDES SALAZAR
HOSPITAL ÁNGELES DEL PEDREGAL
PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO DE BIOLOGÍA DE
LA REPRODUCCIÓN HUMANA.**

PRESENTA:

DRA. EVA HAYDEE OBREGÓN ZEGARRA

**A mis hijas Evita y Sophia quienes son mis fuentes de
inspiración eterna y de amor incondicional.**

ÍNDICE

PÁGINA

DEDICATORIA.....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
RESUMEN.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	5
OBJETIVOS.....	11
HIPÓTESIS.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	12
ALCANCE.....	13
DISEÑO METODOLÓGICO.....	14
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	39
ANEXOS.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	42

INTRODUCCIÓN

La infertilidad es considerada un problema de salud pública, pues según estadísticas, afecta a 10.000 parejas por millón en los países desarrollados, por lo que se acepta que el porcentaje de parejas infértiles se sitúa entre un 10 y 15 % de la población en edad reproductiva (1). Además por causas multifactoriales se observa una tendencia al descenso de las tasas de fertilidad y consecuentemente una mayor necesidad de Técnicas de Reproducción Asistida (2).

Desde que en 1978 se lograra el primer nacimiento de un ser humano mediante técnicas de fecundación in Vitro, las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) han evolucionado con los materiales e implementación tecnológica. Es así que actualmente contamos con técnicas de alta complejidad como son la Fertilización in Vitro (FIV) y la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), pero su evolución puede resultar insuficiente si no realizamos una crítica constante, para ofrecer la mejor opción según el problema específico de cada pareja que requiera tratamiento. La utilización del ICSI brinda la posibilidad de fertilidad a parejas que antes no tenían otras opciones. Actualmente su uso se ha extendido y es aplicada por algunos centros aún en ausencia de factor masculino severo, la cual era su indicación inicial. Sin embargo al ser una técnica invasiva, existen controversias en cuanto a su inocuidad para el embrión, lo cual se reflejaría en la calidad y desarrollo embrionario. Respecto a este tema existen publicaciones con conclusiones contradictorias como las de M. Plachot et al 2002(3) en las que a pesar de no hallar diferencias en la morfología embrionaria ni en las tasas de implantación y embarazo, no recomienda su uso.

Así mismo se deben tener en cuenta las comparaciones de costo-efectividad y de riesgo-beneficio para la elección de la Técnicas de Reproducción Asistida. Por lo tanto es de gran importancia la elección de un método de fertilización, que eleve las tasas de éxito en las parejas que inician tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad, por los altos costos que estos métodos implican, no solo desde el punto de vista económico sino también por el gran desgaste emocional que significa un ciclo fallido (4).

La selección de una técnica adecuada de inseminación repercutirá directamente en el éxito de un ciclo, esta decisión es sencilla si el factor masculino es severo pues no hay otra opción que proponer un método de ICSI, pero en las parejas con factor de infertilidad masculino leve la decisión es más difícil.

Un modelo ideal para comparar los efectos de las técnicas de FIV vs. ICSI, es evaluar las tasas fertilización, desarrollo y calidad embrionaria, utilizando ovocitos “Sibling” (Hermanos) en metafase II, los cuales provienen de un mismo ciclo de estimulación, En nuestro estudio, estos ovocitos fueron asignados una parte a FIV y otra a ICSI, se utilizó la misma muestra espermática para la inseminación, constituyendo así una cohorte homogénea, así al realizar el análisis de los resultados, estos no serán solo producto del azar o de una variable no controlada.

RESUMEN

OBJETIVO: El objetivo de este trabajo es evaluar la influencia de la técnica de fertilización utilizada, FIV convencional o ICSI, sobre los ovocitos obtenidos de un mismo ciclo, a través de comparar los resultados de las tasas de fertilización y el desarrollo embrionario en los ciclos de reproducción asistida de alta complejidad, en parejas cuya causa de infertilidad era un factor de masculino leve.

DISEÑO: Estudio retrospectivo, comparativo transversal.

METODOLOGÍA: Se incluyeron 25 ciclos de los que se obtuvo en total de 399 ovocitos en Metafase II los cuales fueron asignados para la técnica de ICSI o FIV convencional (267 y 132 ovocitos Metafase II respectivamente). Se evaluó la tasa de fertilización (dos pronúcleos: 2PN/Complejo Cumulus-Ovocito), la morfología de los embriones del 2º, 3º, 4º y 5º día según fuera el caso. El semen utilizado era homólogo, obtenido el día de la captura ovocitaria, todos los varones de este estudio presentaban factor masculino leve.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES: La técnica de ICSI además de lograr mejores tasas de fertilización no altera la división celular ni la calidad de los embriones obtenidos; es preferible, si los gametos proceden de una mujer menor de 35 años y/o de un varón menor de 40 años, pues se observan mejores resultados al evaluar los parámetros de desarrollo y calidad embrionaria. Se logra una eficacia mayor en los ciclos con la aplicación de la técnica de ICSI para fertilización.

PALABRAS CLAVE: FIV/ ICSI/ SIBLING OVOCITOS/ DESARROLLO EMBRIONARIO/ FACTOR DE INFERTILIDAD MASCULINO LEVE

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con los avances en las técnicas de reproducción asistida quedan pendientes aún controversias por resolver en cuanto a la inocuidad de métodos como el ICSI, pues al inyectarse el espermatozoide en el óvulo teóricamente se podría producir un daño, el cual se reflejaría posteriormente en el desarrollo y en la calidad embrionaria por ello nos preguntamos ¿Existen diferencias en cuanto a desarrollo y calidad embrionaria en los embriones logrados por FIV o ICSI?

Al revisar la literatura actual sobre el tema, observamos controversias respecto a la evolución de los embriones logrados por ICSI, sin embargo éstas puede ser generadas por el diseño de algunos estudio, además los resultados de muchos de estos estudios no pueden generalizarse pues se realizaron en subgrupos de pacientes muy específicos, por ejemplo no tienen el mismo pronóstico los embriones de parejas con factor tubárico puro o ideopático si se los compara con embriones de parejas donde el factor masculino era severo o embriones de pacientes con edad materna avanzada.

MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

En los programas de reproducción asistida de alta complejidad, el clínico enfrenta la decisión de aplicar FIV vs. ICSI como técnica de fertilización, para la toma de esta decisión se suelen evaluar diferentes parámetros. Desde la introducción del ICSI en la práctica clínica en 1991 (1) su aplicación se ha ido incrementado a la par que se demostraba que los bebés nacidos por esta técnica no tenían mayor diferencia respecto a los nacidos de FIV en cuanto a la incidencia de malformaciones. (2). La indicación inicial del ICSI era la presencia de factor de infertilidad masculino severo que no podía ser tratado con FIV convencional por el escaso número de espermatozoides con motilidad progresiva (5,6 y 7).

Así mismo el ICSI ofreció nuevas expectativas a pacientes con azoospermia obstructiva y no obstructiva (8). Al lograrse la familiarización con la nueva técnica se ha logrado en la curva de aprendizaje tasas de desarrollo embrionario y de embarazo comparables con el FIV convencional (9). Un punto controversial es si el uso de ICSI sería benéfico aún en los casos donde no hay factor masculino involucrado. Actualmente el ICSI es ofrecido conjuntamente con FIV en el primer ciclo de pacientes con subfertilidad masculina asociada a factor tubárico o idiopático para elevar las tasas de fertilización y evitar el riesgo de falla total de fertilización que podría ocurrir si solo se realizara FIV (10,11,12 y13). El Riesgo de Falla Total de la Fertilización ha sido calculado en 12.5% para pacientes normozoospermicos asociados a factor tubárico (3), 16.7% en infertilidad inexplicable (4) y en mas del 50% para casos de astenozoospermia (1 y 5).

En un intento por rescatar ciclos de FIV convencional con falla total de fertilización se les somete a la técnica de ICSI, inyectando espermatozoides en los ovocitos no fertilizados y se obtiene a las 20-24 horas ovocitos normalmente fertilizados, pero esta aplicación del ICSI como intento de rescate de ciclo se asocia

frecuentemente con bajas tasas de embarazo y una alta incidencia de fertilización anormal (8 y 14). Sin embargo un estudio publicado por Yupze et al. en el año 2000 (15) reporta una tasa de embarazo de 20.7% después de rescate de ciclo con ICSI.

Diferentes trabajos se han publicado para evaluar la eficacia y seguridad del ICSI en comparación con el FIV en pacientes con muestras de semen subóptimas (6,7), en infertilidad de causa inexplicable (8,9), en pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico (10), en pacientes con factor tubárico (3) y en la presencia de dos o más factores coexistentes de infertilidad. En estos trabajos mencionados se utilizaron ovocitos hermanos y los resultados y conclusiones que se publican muestran discrepancias.

También se ha publicado que el uso de ICSI innecesario se traduce en mayores costos y sería no ético usar esta técnica a pesar de su efectividad.

Sabemos que para realizar la técnica de ICSI se remueve las células del cumulus y de la corona radiada, se penetra la membrana del ovocito y se inyecta el espermatozoide en el citoplasma del ovocito lo cual podría tener un efecto negativo en la capacidad de desarrollo de embrión humano.

Teóricamente el ICSI sería deletéreo para el desarrollo del embrión, porque durante la fertilización normal (no asistida) el espermatozoide pierde su acrosoma mientras va penetrando la zona pelúcida. La membrana del espermatozoide luego se fusiona con la membrana del ovocito y se produce un aumento transitorio del Calcio citoplasmático lo cual provoca la reacción cortical y se completa la meiosis (16). Por el contrario cuando el espermatozoide se inyecta directamente en el ovocito, el acrosoma y la membrana del espermatozoide están intactas, por lo que la fusión de las membranas del espermatozoide y del ovocito no ocurre, consecuentemente el flujo de calcio se ve alterado en tiempo y secuencia (17 y 18).

Hay autores que reportan una incidencia de 5 - 10% daño del ovocito por ruptura de la membrana celular, incluso hay trabajos como los de Kastrop et al (20) donde se reporta un daño de 14.7% de los ovocitos sometidos a ICSI. El riesgo de alterar el aparato mitótico (SPINDLE) durante la introducción de la pipeta en el procedimiento de ICSI existe, esto lo describieron Asada et al, en 1995; Blake et al., en 2000 y Dumounlin et al., en el año 2001 (20, 21 y 22).

Así como existe la posibilidad de asincronía en la descondensación de los cromosomas de los espermatozoides descrita por Terada et al en el año 2000 (23), hay estudios donde se señala que los embriones obtenidos por ICSI tienen una capacidad reducida para la formación del blastocisto in vitro, particularmente en los casos donde los espermatozoides tienen pobre movilidad y morfología (24 y 25), también se reporta una pobre supervivencia y bajas tasas de implantación de embriones descongelados originados con ICSI si se los compara con los obtenidos de FIV (26), sin embargo otros autores reportan que el ICSI a pesar de inyectar el espermatozoide intacto, no parece reducir las tasas de fertilización en humanos (27), Otros reportes señalan una posible alteración en la dinámica del flujo de Calcio inducida por el espermatozoide, pero esto requiere de mayor investigación. Existen publicaciones que reportan malformaciones y anomalías cromosómicas en los fetos provenientes de ciclos de ICSI (28 y 29) y el riesgo de transmitir la infertilidad y otros defectos genéticos a los recién nacidos, todo esto hace que el ICSI sea aún tema de debate.

La técnica de ICSI es una práctica común en el manejo de la infertilidad con factor masculino severo (5) y es propuesto en parejas donde la calidad del semen es subóptima (leve oligo ± asteno ± teratozoospermia) para disminuir los riesgos de falla total de fertilización (31). Un estudio que compara ovocitos hermanos de 58 parejas de pacientes con subfertilidad masculina no reporta diferencias significativas en cuanto a tasa de fertilización,

morfología embrionaria, clivaje (división embrionaria), ni en las tasas de embarazo e implantación, sin embargo propone que la estrategia de realizar FIV e ICSI simultáneos en ovocitos provenientes de un mismo ciclo, evita el 32.8% de la falla total de fertilización que se producen en ciclos de solo FIV, sobre todo en pacientes con antecedentes de ciclos subsecuentes de FIV (3), por este motivo se realiza ICSI en las parejas con infertilidad de origen inexplicable (32).

Publicaciones que comparan el uso de ICSI vs. FIV en pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico y semen normozoospermico, demuestran mayores tasas de fertilización en el grupo de ICSI comparándolo con el grupo de FIV (ICSI vs. FIV, 72.3+/- 15.5 vs. 44.8 +/- 25.1 %), y ausencia de falla total de fertilización en el grupo de ICSI, este trabajo describe que en el día 2 la morfología y el desarrollo embrionario de ambos grupos no difería, independientemente de la técnica de fertilización utilizada, para este estudio randomizado se utilizaron ovocitos hermanos, los autores concluyen que se debe realizar otro estudio, esta vez aleatorio respecto a las pacientes y no a los ovocitos, para evaluar si el ICSI debe ser realizado en todas las pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico o al menos en una parte de ellas (33).

El grupo de Li y colaboradores publicó un trabajo donde se utilizo la metodología de aleatorización de ovocitos hermanos, se evaluó la técnica de ICSI vs. FIV para parejas con subfertilidad (Grupo A) o infertilidad inexplicable (Grupo B) con 410 ovocitos hermanos, los resultados muestran que la tasa de fertilización es mayor en ICSI (grupo A: 68.2+/- 28.8%; grupo B: 66.2+/- 24.9%) que en FIV convencional (grupo A: 41.8+/-32.7%; grupo B:40.1+/- 22.1%), sin embargo no se observaron diferencias en cuanto a clivaje o morfología de los embriones (34).

Se publicó también la comparación de las técnicas de FIV vs. ICSI con ovocitos hermanos aleatorizados de 56 parejas con factor tubárico y semen normozoospermico; este grupo de pacientes como vemos no tendría una indicación absoluta para la realización del ICSI, sin embargo, ocurrió falla total de fertilización en el 12.5% (7/56 parejas) después de FIV convencional y en 3.6% (2/56 parejas) después de ICSI. Entre estos grupos no se observaron diferencias en cuanto a la tasa de clivaje (86.7+/- 28.0 y 90.1+/- 21%) de los cigotos que evolucionaron a embriones transferibles después de FIV o ICSI respectivamente; No hubo diferencias en cuanto a la calidad de los embriones, a pesar de que la inyección intracitoplasmática y la inseminación de los ovocitos fueran realizadas al mismo tiempo en ambos grupos. En la evaluación a las 42 horas post-inseminación se observaron más embriones en estadio de 4 células posterior a ICSI ($p < 0.001$) en comparación con los embriones provenientes de FIV, es más, en este grupo se observó que un número mayor de embriones permanecían en estadio de 2 células ($p < 0.02$), no hubo diferencia en cuanto a la capacidad de implantación de los embriones obtenidos por ambas técnicas (11) .

La evaluación del clivaje y la calidad embrionaria posterior a ICSI ha sido motivo de diferentes publicaciones, se reporta que en cultivos embrionarios del 2º día no se observaban diferencias significativas, si se comparaban con embriones provenientes de FIV (11 y 13), sin embargo otros autores reportan que la calidad embrionaria (embriones grado A) provenientes de ICSI es superior a la calidad de los obtenidos de FIV (35.4 y 24.3% respectivamente; $p < 0.028$), en estos grupos comparados se aleatorizaron ovocitos hermanos de parejas donde no había factor masculino involucrado (9).

En el año de 1988 Jones et al., demostraron una correlación negativa entre el desarrollo del blastocisto y factor masculino de infertilidad en ausencia de factor femenino, pero no pudo demostrar la influencia de éstas dos técnicas sobre la calidad del embrión. Shoukir et al., 1998 y Dumoulin et al., 2000 (22 y 36), compararon

el desarrollo de los embriones que no fueron transferidos, provenientes de FIV e ICSI y encontraron un mayor porcentaje de blastocistos en el primer grupo.

Shoukir et al., 1998 compararon los parámetros de las muestras de semen de los parejas en que se obtuvo vs. las que no se obtuvo blastocistos, encontrando que en el grupo donde se logró el desarrollo de blastocistos, había una motilidad progresiva significativamente mayor. Miller y Smith., 2001, también encontraron correlación entre el desarrollo de Blastocisto (25) y la concentración o morfología espermática.

Contrariamente Nagy et al., 1998 (8) no encontraron diferencias en el desarrollo del embrión del 2º día obtenido de ICSI, en cuanto a las características del semen, como por ejemplo: concentración, motilidad, morfología o la presencia de anticuerpos antiespermatozoides.

Debido a todos estos reportes contradictorios está en debate, si la capacidad de desarrollo de los embriones se ve afectada por la técnica utilizada para fertilización FIV o ICSI. Estudios donde se utilizaron ovocitos hermanos para determinar, si la técnica de ICSI por si misma, tienen un efecto negativo o no en el desarrollo embrionario, éstas son contradictorias en cuanto a resultados. Griffiths et al., 2000 evaluaron ciclos de FIV-ICSI y reportaron una mayor formación de blastocisto por embrión cultivado, después de aplicar FIV convencional en comparación con ICSI.

En el estudio de Kihaille et al., 2003, se comparó el desarrollo de los embriones hasta el estadio de blastocisto en ovocitos hermanos, en pacientes que presentaban teratozoospermia severa. Estos autores no reportan diferencia en cuanto a la tasa de formación de blastocisto, en embriones que en día 3 tenían al menos 6 blastómeros, ya sea en embriones obtenidos de FIV o por ICSI, a pesar de la mayor tasa de fertilización observada en el grupo ovocitos sometidos a ICSI.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL:

- Evaluar la influencia de las técnicas de fertilización, FIV vs. ICSI, en la tasa de fertilización.
- Evaluar la influencia de las técnicas de fertilización, FIV vs. ICSI, en el desarrollo embrionario.
- Evaluar la influencia de las técnicas de fertilización, FIV vs. ICSI, en la calidad embrionaria.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- Evaluar la eficacia total de ciclo para los ovocitos sometidos a FIV.
- Evaluar la eficacia total de ciclo para los ovocitos sometidos a ICSI
- Identificar posibles criterios para la toma de decisiones clínicas respecto a la selección de la técnica de fertilización a utilizar.

HIPÓTESIS

No hay diferencia en el desarrollo y calidad de los embriones obtenidos por la técnica de FIV o ICSI, en parejas con factor masculino leve.

JUSTIFICACIÓN

El uso de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), como técnica de reproducción asistida se ha incrementado exponencialmente desde su introducción en la práctica clínica en 1991. En la literatura se encuentran opiniones discrepantes en cuanto a la inocuidad de esta técnica en comparación con la fertilización in Vitro convencional (FIV), por lo que es necesario evaluar el riesgo-beneficio de estas técnicas de fertilización y optar por aquella que brinde mejores resultados en cuanto a calidad embrionaria se refiere, con el objeto de lograr mejores tasas de implantación y embarazo. Esta evaluación es importante, si se tiene en cuenta que las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad tienen un alto costo, no sólo económico sino también emocional como se señaló anteriormente.

Los resultados y conclusiones derivados de este estudio serán aplicables en la toma de decisiones clínicas, siempre y cuando las características de esas parejas sean comparables con las incluidas en este estudio.

ALCANCE

La meta del presente estudio es evaluar el efecto de la técnica de fertilización sobre el desarrollo embrionario de los ovocitos de parejas con factor de infertilidad masculino leve. Mediante la comparación de parámetros de fertilización, división y calidad embrionaria. Así como identificar posibles criterios para aplicar FIV o ICSI según las características de las parejas, dichos criterios deberán ser posteriormente evaluados en estudios prospectivos aleatorizados, que nos permitan evaluar el impacto de su utilización en la toma de decisiones clínicas.

DISEÑO METODOLÓGICO

Diseño del Estudio

Estudio retrospectivo, comparativo, transversal.

Población de estudio

Ovocitos hermanos en Metafase II obtenidos de ciclos donde se realizó simultáneamente FIV e ICSI. Capturados en ciclos realizados durante el periodo de junio del 2005 a mayo del 2006 en el Centro de Reproducción asistida “Reproducción y Genética AGN & Asociados” de la Ciudad de México.

Criterios de Inclusión:

- Ovocitos obtenidos de ciclos en los que se realizó FIV e ICSI simultáneamente.
- Ovocitos obtenidos de ciclos en los que se utilizó muestra homologa y fresca de semen
- Ovocitos obtenidos de ciclos de parejas con diagnóstico de factor masculino leve
- Ovocitos obtenidos de ciclos con consentimiento informado firmado

Criterios de Exclusión:

- Ovocitos obtenidos de ciclos en los que se utilizó muestra heteróloga de semen
- Ovocitos obtenidos de ciclos en los que se utilizó muestra congelada de semen

- Ovocitos obtenidos de ciclos en los que en la captura ovular se obtuvieron menos de 6 ovocitos en metafase II
- Ovocitos obtenidos de ciclos de pacientes pobre respondedoras.
- Ovocitos obtenidos de ciclos donde los niveles de estradiol fueron menores a 1000ng/ml. en el día de disparo.
- Falla total de Fertilización de ovocitos asignados a FIV
- Falla total de Fertilización de ovocitos asignados a ICSI
- Falla total de Fertilización de ovocitos asignados a FIV e ICSI

Durante el periodo de junio del 2005 a mayo del 2006 en el Centro de Reproducción asistida “Reproducción y Genética AGN & Asociados” de la Ciudad de México se realizaron 32 ciclos en los cuales se aplicó simultáneamente FIV e ICSI, de estos ciclos se obtuvo un total 518 ovocitos en Metafase II. De los 32 ciclos mencionados, 4 fueron realizados con muestra de semen de donador, estos ciclos fueron excluidos del estudio y sólo se incluyeron los ciclos realizados con muestra homologa de semen.

De los 28 ciclos realizados con muestra homologa, hubo falla en la fertilización en un total de 3 ciclos, los cuales fueron excluidos del estudio retrospectivo, la falla total de fertilización en estos ciclos ocurrió en los ovocitos asignados al método de FIV, no ocurrió ningún caso de falla cuando se utilizaron ambas técnicas (FIV e ICSI) simultáneamente, ni falla en la fertilización en los ovocitos asignados al método de ICSI.

En este estudio se incluyeron un total de 399 Ovocitos hermanos en estadio metafase II, los cuales fueron asignados aleatoriamente: 132 Complejos Cumulus-Ovocito para FIV y 267 Complejos Cumulus-Ovocito para ICSI respectivamente. Se evaluaron principalmente los resultados de la tasa de fertilización, calidad y división embrionaria.

Características de los pacientes

Se analizaron las características de las parejas de los 25 ciclos, de los cuales se obtuvieron los ovocitos incluidos en el estudio, en estas parejas se analizaron la edad, diagnóstico de infertilidad y factor o factores de infertilidad identificados.

Las muestras de semen fueron clasificadas de acuerdo a los criterios de la O.M.S.: oligozoospermia $< 20 \times 10^6$ espermatozoides/ml, astenozoospermia $< 50\%$ de espermatozoides de motilidad grado a + b; teratozoospermia $< 40\%$ de morfología normal. Además clasificamos la motilidad de los espermatozoides de 1 a 4: 1, movilidad sin progresión o in situ; 2, progresión lenta no lineal; 3, progresión lineal; 4, progresión rápida. (39)

Tomamos la definición utilizada por Lucette van der. et al., 2006 (40), para el diagnóstico de Factor de infertilidad masculina leve: alteración de al menos uno de los parámetros, concentración $< 20 \times 10^6$ espermatozoides/ml y/o $< 40\%$ de motilidad grado a +b (302).

Estimulación ovárica y Captura de ovocitos

Las pacientes fueron sometidas a hiperestimulación ovárica controlada, utilizando FSH recombinante (Gonal-F; Serono o Puregon; Organon) y las dosis se ajustaron de acuerdo a la respuesta clínica observada, en combinación con agonistas de GnRH (Lucrin) ó antagonistas (Cetrotide; Serono o Orgalutran; Organon).

La captura de los ovocitos se realizó 36 horas después de la aplicación de hCG 10000 UI (Pregnyl; Organon), la cual se indicaba si al menos tres folículos habían alcanzado el diámetro de ≥ 18 mm., la captura de los ovocitos se realizó por vía transvaginal, mediante la punción de los folículos ováricos bajo guía ultrasonográfica. Cuando

se capturaban al menos 6 ovocitos en Metafase II, éstos eran asignados para FIV o ICSI. Un mayor número de ovocitos fueron asignados a ICSI para garantizar la fertilización.

Muestra seminal:

El día de la captura ovocitaria el semen se obtuvo por masturbación después de 3 a 5 días de abstinencia. Las muestras de semen fueron evaluadas según los criterios de la OMS ya descritos. La muestra de semen fue capacitada por método de gradientes según técnica descrita en el Manual de la Red LARA. La misma muestra de semen se utilizó para realizar los procedimientos de FIV e ICSI.

Procedimiento de Inseminación y Microinyección de espermatozoides.

Los Complejos Cumulus-Ovocito (CCO) se identificaron mediante un microscopio-estereoscópico (lupa) y fueron colocados en el medio de cultivo para inseminación (HTF Irving Scientific) enriquecido al 10% con suero sintético (Substitute Sintetic Serum-Irving Scientific, Santa Ana California USA)

Procedimiento de FIV

Para la inseminación de los ovocitos se utilizó la cantidad de 100,000 espermatozoides móviles (progresión tipo A y B) por 1 ml. de medio de cultivo en el cual eran resuspendidos. La inseminación fue realizada al mismo tiempo que el ICSI.

Procedimiento de ICSI

Los ovocitos fueron desnudados de las células del cumulus y de la corona radiada, mediante un tratamiento enzimático con hialuronidasa (100 IU/ml, disuelta en medio HTF (Hepes, Irving Scientific, Santa Ana California) utilizando una pipeta Pasteur. Las células remanentes del cumulus y de la corona radiada fueron removidas en ausencia de la enzima, se utilizó pipeteo repetitivo con pipetas Pasteur, adelgazadas por calor para obtener un diámetro pequeño, preparadas en nuestro laboratorio. El procedimiento de ICSI fue realizado en una placa para microinyección (Falcon Becton & Dickinson NY, USA, catalogo 35-1006) que contenía 5 gotas de 5- μ L de medio HTF- HEPES suplementado con suero sintético sustituto al 10% (Substitute Sintetic Serum- Irving Scientific, Santa Ana California USA) cubierto con 3.5 mL de aceite mineral (Sydney IVF Cultura Mineral Oil, Indiana, USA). Los ovocitos desnudados fueron examinados para asegurar integridad y madurez nuclear y sólo los ovocitos que habían expulsado en primer cuerpo polar (ovocitos Metafase II) se sometieron a ICSI.

Antes de realizar la microinyección, la gota central fue aspirada y reemplazada por 5 μ L de polivinilpirrolidone (PVP) al 10% en medio de HTF- HEPES-buffer suplementado con suero sintético sustituto al 0.5%. al cual se adiciono una gota con espermatozoides capacitados. Se empleo un microscopio invertido Nikon (Nikon Corporation Instruments Company) adaptado con dos micromanipuladores, uno de "Holding" y otro micromanipulador para realizar la microinyección (marca Narishige). La preparación y el procedimiento de ICSI se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Van Steirteghem et al. (1993). Después del procedimiento de ICSI, los ovocitos fueron cultivados en medio de cultivo hasta el momento de evaluación pronuclear.

Evaluación de fertilización y de calidad embrionaria

En la mañana del primer día (16 a 18 horas post-inseminación) se evaluó la tasa de fertilización de los ovocitos. Para ambos procedimientos, la tasa de fertilización se calculó: como el número de ovocitos con dos pronúcleos (2PN) dividido entre el número de complejos cumulus-ovocitos asignados. Los ovocitos con fertilización anormal (1PN o 3PN) fueron excluidos. Los embriones con fertilización normal fueron cultivados por 24 horas más. Los embriones se clasificaron de acuerdo al esquema de Veeck 1999 simplificado: tipo A embriones con blastómeros de igual tamaño y con fragmentación presente $\leq 10\%$ del volumen del embrión, tipo B embriones con blastómeros desiguales en tamaño y/o fragmentación 10 -30% y Tipo C embriones con fragmentación $> 30\%$. Ver Anexo1

Valoración del Ciclo

La eficacia promedio del total de los ciclos según la técnica aplicada (FIV vs. ICSI) se calculó dividiendo el número de embriones utilizados en transferencia o en congelación entre la cantidad total de 2PN obtenidos para cada técnica

La Tasa de formación de blastocistos por técnica, fué calculada: dividiendo número total de blastocistos obtenidos entre el número de 2PN obtenidos, los embriones transferidos o congelados en 2º y 3er. día eran restados del número de 2PN obtenidos [blastocistos/2PN-(congelados + transferidos)] para cada técnica.

Transferencia Embrionaria

Dado que los embriones fueron obtenidos por FIV e ICSI, los mejores embriones de ambas técnicas fueron seleccionados para Transferencia Embrionaria, la cual podía ser mixta, es decir embriones de FIV e ICSI al mismo tiempo.

La transferencia embrionaria fue realizada en el segundo día en 11 ciclos, en el tercer día en 11 ciclos y en quinto día en 2 ciclos. En un ciclo se canceló la transferencia embrionaria por riesgo de Síndrome de Hiperestimulación ovárica. Si después de la transferencia se contaba aún con embriones restantes, no arrestados ni degenerados, estos se congelaban. De tal manera que se congelaron embriones en segundo, tercer y quinto día.

Análisis Estadístico

Se calculó el poder con un error α de 5 % y un error β de 20%, para ello se utilizó el paquete estadístico PASS 6.0 (NCSS, USA). En base a la revisión bibliográfica, se asumió que la tasa esperada de fertilización era del 50% en el grupo de FIV y del 65% en el grupo de ICSI, por lo que se calculó que el tamaño muestra necesario era de 130 ovocitos como mínimo, en cada grupo.

Se utilizaron pruebas t-test pareadas y no pareadas y χ^2 para el análisis estadístico, donde un $p < 0.05$ fue considerado significativo. El análisis fue realizado utilizando el programa SPSS paquete estadístico para Windows 10.0 (SPSS Inc., USA)

RESULTADOS

Características de los pacientes

Al evaluar la características de las 25 parejas cuyos ovocitos fueron incluidos en el estudio, la edad promedio de las mujeres fue 35.84 ± 2.3 años (rango de 28 a 45 años) y la edad promedio de los varones fue 38.64 ± 6.04 años (rango de 21 a 51 años). Ver Tabla 1.

Las parejas con diagnóstico de infertilidad primaria fueron 15 (60 %) y las de infertilidad secundaria fueron 10 (40 %). La causa de infertilidad se debió a factor masculino en 2 parejas y en las 23 parejas restantes además del factor masculino, estaban presentes causas de infertilidad por factor femenino. Los diagnósticos de las causas de infertilidad por factor femenino fueron: ideopática (n=1), tubárica (n=4), endometriosis (n=6), síndrome de ovario poliquístico (n=3), falla ovárica prematura (n=1) y edad (n=8).

Tabla 1

Edad de los pacientes de los ciclos incluidos

Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.

Junio 2005 - Mayo 2006

Total de ciclos (parejas)	25
Edad de la mujer (años)	35.8 ± 2.3
Edad del varón (años)	38.6 ± 6

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

Calidad del Semen:

Al evaluar las 25 muestras homologas de semen obtenidas el día de la captura ovular, los resultados fueron: concentraciones de 131.03×10^6 /mL (rango de $364 - 35 \times 10^6$ /mL), con un 46.8% de movilidad tipo A+B (rango de 62-30%), una morfología normal de 11.32% (rango de 17-5%) y TEM de 148.88×10^6 /mL (rango de $520 - 15 \times 10^6$ /mL en un volumen de 2.7 mL (rango de 1 a 7.2 cc) .

Tabla 2

Todas las muestras cumplían los requisitos mínimos para la realización de Fertilización in Vitro, sin embargo, todas presentaban alteraciones en la motilidad y/o morfología, 15 pacientes tenían astenoteratozoospermia y 10 teratozoospermia, este tipo de muestras seminales son denominadas en algunas publicaciones como correspondientes a factor de infertilidad masculino leve (38 y 39).

Tabla 2

Características del Semen

Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.

Junio 2005 - Mayo 2006

- Concentración $\times 10^6/\text{mL}$	131.03 \pm 90.7
- Movilidad %	46.8 \pm 9.1
- Morfología normal	11.32 \pm 2.8
- TEM $\times 10^6$	148.4 \pm 10.8
- Volumen mL	2.7 \pm 1.4

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

Fertilización y Calidad Embrionaria

1º DÍA

De los de 25 los ciclos cuyos ovocitos se incluyeron en el estudio; El promedio de ovocitos metafase II capturado por ciclo fue de 16, de ellos el promedio de ovocitos metafase II asignado a ICSI fue 10.7 y el asignado a FIV fue 5.3. Se observaron tasas similares de fertilización adecuada, es decir obtención de 2PN, en 203/267 de los ovocitos asignados para ICSI vs. 92/132 de los ovocitos asignados para FIV (76% vs. 69.7%, $p=0.175$). Tampoco se observaron diferencias en cuanto a la calidad de los ovocitos obtenidos por una u otra técnica (Tabla 3 y 4). En ningún ciclo incluido en el estudio ocurrió falla total de la fertilización, ya que éste fue un criterio de exclusión.

Tabla 3

Tasa de Fertilización de ovocitos según técnica: FIV vs. ICSI (1º día)*
 Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.
 Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=399)	FIV (n=132)	ICSI (n=267)
Promedio ovocitos / ciclo	10.7 ± 2.1	5.3 ± 2.8
Tasa de Fertilización 2PN/OCC%	92/132(69.7%)	203/267(76%) *
1PN	1	0
2PN	92	203
3PN	10	13
Degenerados	6	17
Pb+	23	31
2 Pb+	0	3

* χ^2 Pearson = 1,836 (p=0.175)

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

Tabla 4

Calidad de 2PN según técnica: FIV vs. ICSI (1º día)*
 Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.
 Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=295)	FIV (n=92)	ICSI (n=203)
A+	7 (7.6%)	14 (6.9%)
A	44 (47.8%)	125 (61.6%)
B	38 (41.3 %)	57 (28.1%)
C	3 (3.3%)	7 (3.4%)

* χ^2 Pearson = 5,58 (p=0.134)

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

En el análisis estratificado del día 1 se observa:

Al comparar la Tasa de Fertilización por FIV vs. ICSI no hay diferencias, si analizamos aisladamente la edad de los progenitores. Pero cuando se realizó el análisis simultáneo de los grupos de edad paterno y materno, podemos observar que si los ovocitos procedían de mujeres menores de 35 años y el semen era de un hombre menor de 40 años, el ICSI brindaba mejores posibilidades de fertilización (Chi Square 6.745 con un $p=0.009$). Tabla 5

Tabla 5

Análisis estratificado de 2PN según técnica: FIV vs. ICSI (1º día)
Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.
Junio 2005 - Mayo 2006

	n=399	Técnica	% Fertilización 2PN	χ^2 Pearson
EDAD MATERNA	< 35 a. (n=228)	ICSI (n=156)	79,4	3,517 (p=0.068)
		FIV (n=72)	68,0	
	≥ 35 a. (n=171)	ICSI (n=111)	71,1	0,802 (p=0.371)
		FIV (n=60)	71,6	
EDAD PATERNA	< 40 a. (n=276)	ICSI (n=184)	77,1	3,725 (p=0.05)
		FIV (n=92)	66,3	
	≥ 40 a. (n=123)	ICSI (n=83)	73,4	0,230 (p=0.632)
		FIV (n=40)	77,5	
EDADES DE LA PAREJA	M<35 & P<40 (n=139)	ICSI (n=94)	84,0	6,745 (p=0.009)
		FIV (n=45)	64,4	
	M<35 & P≥40 (n=89)	ICSI (n=62)	72,5	0,021 (p=0.884)
		FIV (n=27)	74,0	
	M≥35 & P<40 (n=137)	ICSI (n=90)	70,0	0,053 (p=0.517)
		FIV (n=47)	68,0	
	M≥35 & P≥40 (n=34)	ICSI (n=21)	76,1	0,349 (p=0.555)
		FIV (n=13)	84,6	

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

En cuanto a la calidad de los 2PN obtenidos por ICSI vs. FIV, observamos una tendencia a obtener mejor calidad en los obtenidos por ICSI (calidad A+ 14/203, calidad A 125/203, calidad B 57/203, calidad C 7/203) en comparación con los obtenidos por FIV (calidad A+ 7/92, calidad A 44/92, calidad B 38/92, calidad C 3/92), Chi cuadrada de 5.58 y un $p = 0.134$. No se encontró diferencias en la calidad de los 2PN si se evalúa edad materna y paterna aisladamente. Pero al realizar el análisis simultáneo de los grupos etáreos descritos en cuanto a calidad y técnica de fertilización empleada, se observó que en el grupo de 2PN obtenidos en parejas donde la mujer es <35 años y el varón ≥ 40 años, los embriones obtenidos por ICSI eran de mejor calidad que los obtenidos por FIV, con una Chi cuadrada de 13.683 y una $p = 0.003$

Si evaluamos calidad por técnica FIV vs. ICSI en ovodonadoras, observamos mejor calidad embrionaria en los 2PN obtenidos por ICSI, con un Chi Cuadrada de 14.476 y $p = 0.002$.

En 1er. día se congelaron un total de 28 embriones en estadio 2PN, obtenidos por la ICSI y 12 embriones obtenidos por la FIV convencional. (Ver Anexos 2 y 3)

2º DÍA

No hay diferencia en clivaje (división) de los embriones obtenidos por FIV 172/175 (98.3%) vs. ICSI 78/80 (97.5%). Cuando se evaluó la calidad del total de embriones segmentados, no hubo diferencias estadísticas al comparar ICSI vs. FIV. (Tabla 7 y 8)

Tabla 7

Evaluación de división según técnica: FIV vs. ICSI (2° día)*
 Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.
 Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=255)	FIV (n=80)	ICSI (n=175)
1-3 células	30 (37.5%)	59 (33.7%)
≥ 4 células	48 (60%)	113 (64.6%)
Arrestado/2PN	2 (2.6%)	2 (1.1%)
Degeneró	0	1 (0.6%)

* χ^2 Pearson = 3,05 (p=0.548)

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

Tabla 8

Calidad de embriones divididos según técnica: FIV vs. ICSI (2° día)*
 Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.
 Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=250)	FIV (n=78)	ICSI (n=172)
1+	5 (6.4%)	23 (13.4%)
2+	42 (53.8%)	100 (58.1%)
3+	22 (28.2 %)	31 (18%)
4+	7 (9.0%)	14 (8.1%)
5+	2 (2.6%)	4 (2.3%)

* χ^2 Pearson = 5,178 (p=0.27)

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

En el análisis estratificado del 2° día observamos:

Los embriones de ovodonadoras tienen una tendencia a mejor división, es decir embriones ≥ 4 si la ICSI fue la técnica utilizada (ICSI 77.1% vs. FIV 55.6%, p= 0.105). No se observó diferencia en el número de embriones divididos en relación a la edad paterna en el segundo día. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el número de embriones divididos en cuanto a ovodonación, factor o tipo de infertilidad.

La calidad de los embriones divididos en mujeres menores de 35 era mejor si se obtenían por ICSI (Chi Square de 10.460 y $p=0.033$). Cuando se analizó la edad del varón, se observó que en menores de 40 años era también mejor la ICSI logrando embriones de mejor calidad (Chi Cuadrada de 13.450 y $p=0.009$). Por lo cual no sorprendió cuando al analizar conjuntamente la variable edad de los progenitores se observó una mejor calidad de embriones divididos obtenidos por la ICSI, en parejas donde la mujer era menor de 35 y el varón menor de 40 años (Chi Cuadrada de 13.309 y $p=0.010$). Tabla 9

Tabla 9

Análisis estratificado de los embriones de ≥ 4 células según técnica: FIV vs. ICSI 2º día.

Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.

Junio 2005 - Mayo 2006

	n=250	Técnica	≥ 4 células	χ^2 Pearson
EDAD MATERNA	< 35 a. (n=147)	ICSI (n=104)	62,5	0,053 (p=0.817)
		FIV (n=43)	60,4	
	≥ 35 a. (n=103)	ICSI (n=68)	70,6	0,634 (p=0.853)
		FIV (n=35)	62,8	
EDAD PATERNA	< 40 a. (n=174)	ICSI (n=98)	61,2	0,851 (p=0.423)
		FIV (n=36)	55,5	
	≥ 40 a. (n=76)	ICSI (n=39)	58,9	1,679 (p=0.195)
		FIV (n=24)	62,0	
EDADES DE LA PAREJA	M<35 & P<40 (n=98)	ICSI (n=72)	62,5	0,068 (p=0.794)
		FIV (n=26)	65,4	
	M<35 & P \geq 40 (n=49)	ICSI (n=32)	62,5	0,42 (p=0.517)
		FIV (n=17)	52,9	
	M \geq 35 & P<40 (n=76)	ICSI (n=52)	65,4	0,06 (p=0.807)
		FIV (n=24)	62,5	
	M \geq 35 & P \geq 40 (n=27)	ICSI (n=16)	87,5	2,148 (p=0.143)
		FIV (n=11)	63,6	

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

Cuando se analizaron los factores de infertilidad, se observó una mejor calidad de los embriones obtenidos por la ICSI en paciente con factor tubárico puro (Chi Cuadrada de 7.927 y $p=0.048$), esto se puede explicar por que estas pacientes eran además menores de 35 años.

Las pacientes con infertilidad secundaria lograron embriones divididos de mejor calidad, si la técnica realizada fué la ICSI (Chi Square de 9.605 y $p=0.048$).

En 2º día se transfirieron 31 embriones obtenidos por la ICSI y 11 embriones obtenidos por la FIV. Se congelaron 43 embriones obtenidos por la ICSI y 19 embriones obtenidos por la FIV. (Ver Anexos 2 y3)

3º DÍA

Se observó una mejor división, (embriones ≥ 8 células) cuando la técnica aplicada fué la ICSI (χ^2 Pearson = 9,763 y $p=0.008$). Tablas 10 y 11

Tabla 10

Desarrollo Embrionario según técnica: FIV vs. ICSI (3º día)

Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.

Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=146)	FIV (n=48)	ICSI (n=98)
< 8 células	34 (70.8%)	45 (45.9%)
≥ 8 células	11 (22.9%)	49 (50%)
Arrestado	3 (6.3%)	4 (4.1%)

χ^2 Pearson = 9,763 ($p=0.008$): significativo

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

Tabla 11

Calidad Embrionaria según técnica: FIV vs. ICSI (3° día)

Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.

Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=139)	FIV (n=45)	ICSI (n=94)
1+	2 (4.4%)	14 (14.9%)
2+	12 (26.7%)	30 (31.9%)
3+	14 (31.1 %)	23 (24.5%)
4+	6 (13.3%)	10 (10.6%)
5+	11 (24.4%)	17 (18.1%)

* χ^2 Pearson = 4,471 (p=0.346)

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

En el análisis estratificado del 3° día observamos:

Los embriones obtenidos por ICSI lograron mejor división que los obtenidos de FIV si la mujer era menor de 35 años (Chi Cuadrada de 11.528 y una $p=0.001$), si el varón era menor de 40 años (Chi cuadrada de 8.305 y $p=0.004$). Por esto, cuando los gametos de parejas jóvenes, mujer menor de 35 años y varón menor de 40 años, eran sometidos a ICSI, se obtenían más embriones de ≥ 8 células (Chi cuadrada de 6.691 y $p=0.010$). Siendo también la ICSI la técnica con mejores resultados en parejas donde la mujer era menor de 35 y el varón mayor de 40 años (Chi cuadrada de 4.148 y $p=0.042$). Tabla 12

La ICSI obtuvo embriones con mejor división en comparación a los obtenidos por la FIV, en ciclos realizados con óvulos de la propia paciente (Chi cuadrada de 9.224 y una $p=0.002$), en pacientes con infertilidad primaria (Chi cuadrada de 7.966 y $p=0.005$), en pacientes con endometriosis (Chi cuadrada de 6.222 y $p=0.013$) y también si la causa era Factor tubárico (Chi cuadrada de 5.475 y $p=0.019$), esto último se puede asociar al hecho de que todas las pacientes con factor tubárico del estudio fueron menores de 35 años.

Tabla 12

Análisis estratificado de los embriones de ≥ 8 células según técnica: FIV vs. ICSI (3° día)

Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.

Junio 2005 - Mayo 2006

	n=139	Técnica	≥ 8 células	χ^2 Pearson
EDAD MATERNA	< 35 a. (n=88)	ICSI (n=65)	53,8	11,528 (p=0.001)
		FIV (n=23)	13,0	
	≥ 35 a. (n=51)	ICSI (n=29)	48,3	0,724 (p=0.395)
		FIV (n=22)	36,4	
EDAD PATERNA	< 40 a. (n=118)	ICSI (n=82)	53,7	8,35 (p=0.004)
		FIV (n=36)	25,0	
	≥ 40 a. (n=21)	ICSI (n=12)	41,7	0,875 (p=0.350)
		FIV (n=9)	22,2	
EDADES DE LA PAREJA	M<35 & P<40 (n=72)	ICSI (n=56)	55,4	6,691 (p=0.01)
		FIV (n=16)	18,8	
	M<35 & P \geq 40 (n=16)	ICSI (n=9)	44,4	4,148 (p=0.042)
		FIV (n=7)	0	
	M \geq 35 & P<40 (n=46)	ICSI (n=26)	50	1,865 (p=0.172)
		FIV (n=20)	30	
	M \geq 35 & P \geq 40 (n=5)	ICSI (n=3)	33,3	2,222 (p=0.136)
		FIV (n=2)	100	

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

Cuando analizamos la calidad de los embriones obtenidos en 3er día, no observamos diferencias significativas entre los obtenidos por la FIV vs. la ICSI. Sin embargo hay una tendencia a una mejor calidad embrionaria en los obtenidos por ICSI si se le compara con los obtenidos por FIV, si la mujer era menor de 35 años o si el varón era menor de 40 años, aunque no se demostró diferencia estadísticamente significativa.

En día 3 fueron transferidos 26 embriones obtenidos por la ICSI y 7 embriones obtenidos por la FIV convencional. Así mismo

fueron congelados 32 embriones obtenidos por la ICSI y 17 embriones obtenidos por la FIV. (Ver Anexos 2 y 3)

4° DÍA

El desarrollo embrionario óptimo esperado para este día, es la formación de mórulas, lo cual se logró en una proporción mayor en embriones obtenidos de la ICSI 8/22 en comparación a los obtenidos por la FIV 0/14 (χ^2 Pearson = 8,867; p=0.031) Tabla 13 y 14

Tabla 13

Desarrollo Embrionario según técnica: FIV vs. ICSI (4° día)
Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.
Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=57)	FIV (n=21)	ICSI (n=36)
No mórula	14 (66.7%)	14 (38.9%)
Mórula	0	8 (22.2%)
Arrestó	6 (28.6%)	14 (38.9%)
Degeneró	1 (4.8%)	0

* χ^2 Pearson = 8,867 (p=0.031): significativo

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

Tabla 14

Calidad Embrionaria según técnica: FIV vs. ICSI (4° día)
Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.
Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=36)	FIV (n=14)	ICSI (n=22)
1+	0	2 (9.1%)
2+	0	0
3+	1 (7.1%)	5 (22.7%)
4+	4 (28.6%)	2 (9.1%)
5+	9 (64.3%)	13 (59.1%)

* χ^2 Pearson = 4,505 (p=0.212)

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

En el análisis estratificado del 4° día observamos:

Se mantiene el logro de un mejor desarrollo embrionario con el uso de la ICSI, en comparación al uso de la FIV, en mujeres menores de 35 años (Chi cuadrada de 3.939 y $p=0.047$) y en varones menores de 40 años (Chi cuadrada de 7.200 y $p=0.007$).
Tabla 15

Tabla 15

Análisis estratificado según técnica: FIV vs. ICSI (4° día).

Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.

Junio 2005 - Mayo 2006

	n=36	Técnica	Mórula	χ^2 Pearson
EDAD MATERNA	< 35 a. (n=28)	ICSI (n=17)	29,4	3,939 (p=0.047)
		FIV (n=11)	0	
	≥ 35 a. (n=8)	ICSI (n=5)	60,0	2,880 (p=0.09)
		FIV (n=3)	0	
EDAD PATERNA	< 40 a. (n=24)	ICSI (n=15)	53,3	7,200 (p=0.007)
		FIV (n=9)	0	
	≥ 40 a. (n=12)	ICSI (n=7)	0	-
		FIV (n=5)	0	
EDADES DE LA PAREJA	M<35 & P<40 (n=18)	ICSI (n=12)	41,7	3,462 (p=0.06)
		FIV (n=5)	0	
	M<35 & P≥40 (n=10)	ICSI (n=5)	0	-
		FIV (n=5)	0	
	M≥35 & P<40 (n=6)	ICSI (n=3)	100	6,000 (p=0.014)
		FIV (n=3)	30	
	M≥35 & P≥40 (n=2)	ICSI (n=2)	0	-
		FIV (n=0)	-	

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

La calidad de los embriones obtenidos por la ICSI fué superior a los obtenidos por la FIV en la evaluación del cuarto día (Chi square de 8.625 con un $p=0.035$). En el cuarto día no se realizaron transferencias ni congelaciones embrionarias. (Ver Anexos 2 y 3)

5° DÍA

En la evaluación embrionaria del quinto día se tenían un total de 22 embriones obtenidos por la ICSI y 14 embriones obtenidos por la FIV convencional. De ellos solo 5 embriones obtenidos mediante la ICSI y 1 mediante la FIV llegaron al estadio de blastocisto. No hubo diferencias relacionadas a la técnica empleada (FIV vs. ICSI) en cuanto a: número de blastocistos ni en la calidad de los mismos. El análisis estratificado para este día no se realizó porque el número de casos fue insuficiente para aplicar las pruebas estadísticas. Tabla 16 y 17

Tabla 16

Desarrollo Embrionario según técnica: FIV vs. ICSI (5° día)

Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.

Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=36)	FIV (n=14)	ICSI (n=22)
No blasto	1 (7.1%)	4 (18.19%)
Blasto	1 (7.1%)	5 (22.7%)
Arrestó	11 (78.6%)	8 (36.4%)
Degeneró	1 (7.1%)	5 (22.7%)

* χ^2 Pearson = 3,696 (p=0.296)

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

En quinto día se transfirieron 3 embriones obtenidos por la ICSI y 1 embrión obtenido por la FIV convencional. Así mismo fueron congelados 2 embriones obtenidos de la ICSI y ninguno de los obtenidos por la FIV. (Ver Anexos 2 y3)

Tabla 17

Análisis estratificado según técnica: FIV vs. ICSI (5° día).

Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.

Junio 2005 - Mayo 2006

	n=7	Técnica	Blastocisto	χ^2 Pearson
EDAD MATERNA	< 35 a. (n=4)	ICSI (n=4)	100	-
		FIV (n=0)	-	
	≥ 35 a. (n=3)	ICSI (n=2)	50,0	0,750 (p=0.386)
		FIV (n=1)	100	
EDAD PATERNA	< 40 a. (n=6)	ICSI (n=5)	100	-
		FIV (n=1)	100	
	≥ 40 a. (n=1)	ICSI (n=1)	0	-
		FIV (n=0)	-	

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

VALORACIÓN DEL CICLO

En los ciclos se observó que la eficacia promedio lograda por la ICSI fué 165/203 (81.3%) y por la FIV fué 67/92 (72.8 %). Lo cual indica, una mejor eficacia asociada al uso de la ICSI como técnica de fertilización (Prueba Z = 1,65 y p= 0.04). Tabla 18

Tabla 18

Eficacia total del ciclo según técnica: FIV vs. ICSI

Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.

Junio 2005 - Mayo 2006

EFICACIA TOTAL DEL CICLO	FIV	ICSI
Embriones transferidos + congelados ----- 2PN	72.8%	81.3%

* Prueba Z = 1,65 (p=0.0495): significativo

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

No se hallaron diferencias estadísticas para la Tasa de formación de blastocistos al comparar FIV vs. ICSI (4% VS. 13.1%, prueba $Z=1.2$ y $p=0.11$). Tabla 19

Tabla 19

Tasa de formación de blastocistos según técnica: FIV vs. ICSI
Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.
Junio 2005 - Mayo 2006

TASA DE FORMACION DE BLASTOCISTOS	FIV	ICSI
Blastocistos ----- 2PN - (congelados + transferidos)	$1/\{92-(19+48)\}=4\%$	$5/\{203-(60+105)\}=13.1\%$

* Prueba $Z = 1,20$ ($p=0.11$)

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados

DISCUSIÓN

Las técnicas de fertilización tienen como primer reto la formación de 2PN en primer día, si bien la tasa de fertilización para ICSI y FIV fué similar en este grupo de estudio (76% vs. 69.7%, $p=0.175$), se debe mencionar que si consideramos los 3 ciclos excluidos por falla en la fertilización de los ovocitos asignados a la FIV convencional, sería evidente una mayor tasa de fertilización por la ICSI 245/ 317 a comparación de la obtenida por la FIV 92/ (77.3% vs. 60.1%, $p < 0.0001$). En los ciclos donde la fertilización fue lograda solo por ICSI, los parámetros de concentración y total de espermatozoides móviles no eran limitante para realizar FIV (130.6×10^6 /mL y 66.3×10^6 /mL. en promedio). Estas tasas mayores de fertilización para ICSI, coinciden con otros estudios (41 y 42); sin embargo hay autores que sostienen que la tasa de fertilización es igual para la ICSI y la FIV (43 y 44) en este último estudio, se incluyeron parejas con factor tubárico y muestras normozoospermicas.

No se observó un efecto negativo de la ICSI sobre la división embrionaria, pues en segundo día se observó división de 172/203 (98.8%) vs. 78/92 (97.8%), en los embriones obtenidos de la ICSI y de la FIV respectivamente. Durante los dos primeros días de desarrollo embrionario algunos autores reportan, evolución y tasas de arresto similares para la FIV y la ICSI (45,46 y 47), lo cual se explica por el hecho de que en 3er. día hay activación del genoma embrionario, fenómeno descrito por Fraude et al (48 y 49).

El desarrollo embrionario a partir del tercer día fué mejor en los embriones fertilizados por la ICSI, lo cual difiere con algunos estudios publicados que describen mejor división de los embriones obtenidos por la FIV en comparación a los obtenidos por la ICSI, en día 3 (54% vs. 38%) y en día 5 (45% vs. 32%), este estudio se caracterizaba por la ausencia de factor masculino de infertilidad (50).

Otros autores reportan una pobre división de los embriones obtenidos por la ICSI cuando el factor masculino era severo (51,52), y en otros estudios se utilizaron muestras de semen descongeladas (53). Como podemos inferir los resultados no pueden ser comparables entre sí, pues son poblaciones de estudio con características muy específicas y diferentes.

En el análisis estratificado, se observó de manera constante que a partir del 3er. día la ICSI se lograban embriones de mejor división, si los progenitores eran jóvenes (mujer menor de 35 años y/o varón menor de 40 años), hecho que se reporta en la literatura, de lograr mejores embriones en mujeres jóvenes mediante FIV (54).

La Tasa de formación de blastocistos para la ICSI y la FIV no presentó diferencias estadísticas significativas en nuestro trabajo, coincidiendo con lo ya comunicado por otros autores (55 y 56), en estos estudios reportan tasas similares de formación de blastocistos (50.2% para la ICSI y 54.8% para la FIV), aunque otros autores reportan que en ausencia de un factor de infertilidad masculino, el número de embriones desarrollados normalmente en 5° día fué mayor en el grupo de la FIV, comparado con el de la ICSI (45% vs. 32%). Sin embargo debemos estar concientes que para evaluar la tasa de formación de blastocistos, el diseño ideal de estudio, es aquel en el cual, todos los embriones son cultivados hasta el quinto día post captura ovular y sólo en ese día se realizan las transferencias embrionarias.

Los resultados de eficacia total de los ciclos calculada para FIV e ICSI en nuestro estudio, indican una superioridad del ICSI. En la literatura publicada no se reportan diferencias.

Como vemos, es difícil encontrar coincidencias en cuanto a resultados con los estudios publicados, ésto se debe a que no siempre eran poblaciones de estudio comparables con la nuestra.

Este es el principal problema que crea controversia y debate en relación a los resultados de las técnicas de fertilización, pues los resultados en grupos de pacientes con características específicas son extrapolados a la población general por algunos autores.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

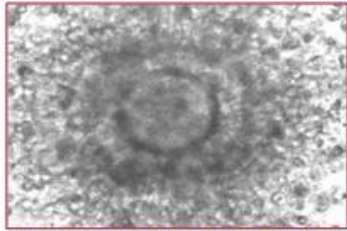
- La ICSI además de lograr mejores tasas de fertilización, no altera la división ni la calidad de los embriones obtenidos.
- La ICSI es de elección si los gametos proceden de una mujer menor de 35 años y/o de un varón menor de 40 años, pues se observa mejores resultados en el desarrollo y la calidad embrionaria.
- Se logra una eficacia mayor total en los ciclos, con la aplicación de la técnica de la ICSI para fertilización.
- Este estudio apoya el criterio de que en un primer ciclo de alta complejidad, que se realiza en una pareja donde existe factor masculino que no sea indicación absoluta de ICSI es razonable realizar FIV e ICSI simultáneamente, para evitar la cancelación de la transferencia debido a falla total en la fertilización. Además este método sirve de ensayo o prueba pronóstica pues evalúa la calidad de los gametos.



REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA AGN

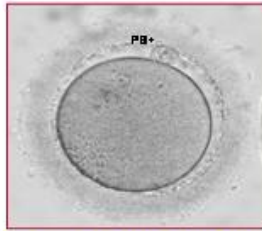
Desarrollo Preimplantacional de Embriones Humanos

DÍA 0
30 minutos post-captura



Óvulo con células de la granulosa. Note la expansión de las células de la *Corona radiata* (formación de un anillo alrededor del ovocito) y del *Cumulus ophorus* (separación reciente de las células del cumulus). Forma esférica del ovocito con citoplasma claro. No se observa el Cuerpo Polar (PB+).

DÍA 0
4-6 horas post-captura



Óvulo libre de células del cumulus. Note la presencia del Cuerpo Polar (PB+) lo cual indica que se encuentra en la etapa de Metáfase-II.

DÍA 1
16-18 horas post-inseminación



Óvulo fertilizado (Zigoto). En el Citoplasma se observan dos pronúcleos (de origen materno y paterno - P N) y la formación de un "Halo". En el Espacio Perivitellino (EP) se observan dos Cuerpos Polares (PB+).

DÍA 2
40-42 horas post-inseminación



Preembrión con cuatro Blastómeros (B) simétricos. Los dos Cuerpos Polares (PB+) se encuentran asociados al blastómero superpuesto en la imagen.

DÍA 3
64-66 horas post-inseminación



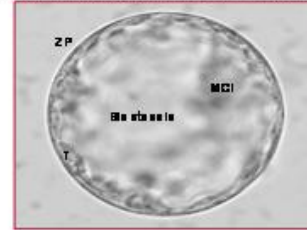
Preembrión con ocho Blastómeros (B) simétricos (estado conocido como Morula). Observe la excesiva fragmentación (Fg) citoplasmática.

DÍA 4
88-90 horas post-inseminación



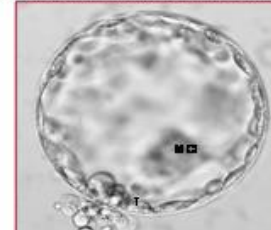
Preembrión Cavitando. Note la tención de los blastómeros y la formación temprana de la cavidad central (llamada blastocelo).

DÍA 5
114-116 horas post-inseminación



Blastocisto Expandido. Note la expansión del blastocelo que genera el adelgazamiento de la Zona Pelúcida (ZP). La Masa Celular Interna (MCI) se encuentra fuera de foco y las células del Trofoblasto (T) forman la pared del preembrión.

DÍA 5.5
126-128 horas post-inseminación



Etapas tempranas del proceso de "Hatching". Observe la Masa Celular Interna (MCI) fuera de foco y las células del Trofoblasto (T) que comienzan a salir de la delgada Zona Pelúcida (ZP).

Dr. Humberto Camacho Pineda

Anexo No. 2

Distribución de embriones según el día de transferencia
Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.
Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=79)	FIV (n=19)	ICSI (n=60)
1° día 2PN (n=0)	0	0
2° día (n=42)	11	31
3° día (n=33)	7	26
4° día (n=0)	0	0
5° día (n=4)	1	3

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

Anexo No. 3

Distribución de embriones según el día de congelación
Clínica de Reproducción y Genética AGN y asociados.
Junio 2005 - Mayo 2006

Total (n=153)	FIV (n=48)	ICSI (n=105)
1° día 2PN (n=40)	12	28
2° día (n=62)	19	43
3° día (n=49)	17	32
4° día (n=0)	0	0
5° día (n=2)	0	2

Fuente: Base de datos de la Clínica de Reproducción y Genética AGN y Asociados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancies after intracytoplasmic injection of spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340: 17-8
2. Bounduelle M, Legein J, Derde MP, Buysse A, Schiettecatte J, Wisanto A, et al. Comparative follow-up study of 130 children born after ICSI and 130 children born alter IVF. *Hum Reprod* 1995; 10: 3327-31.
3. Plachot, M., Belaisch-Allarch, J., Mayenga J. M.& Chouraqu, A. Outcome of conventional IVF and ICSI on Sibling OOcytes in mild male factor infertility. *Human Reproduction* 2002; 17: 362-369.
4. Staessen C, Camus M, Clasen K, De Vos A, Van Steirteghem A. Conventinal in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Human Reprod* 1999; 14:2474-9.
5. Elizur SE, Levron J, Seidman DS, Kees S, Levran D, Dor J Conventinal in vitro fertilization versus intracytoplasmic for sibling oocytes in couples with mild oligoteratoasthenozoospermia and couples with normal sperm. *Fert Steril* 2004; 82: 241-3
6. Van Steirteghem AC, Nagy ZP, Joris H et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1993; 8:1061-6
7. Van Steirteghem AC, Joris H and Lui J. Protocol for intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod Updated*, 1 , CD ROM
8. Hershlag A, Paine T, Kvapil G, Feng H, Napolitano B. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection split: an insemination method to prevent fertilization failure. *Fert Steril* 2002; 77: 229-32
9. Verheyen G, Tournaye H, Staessen C, De Vos a, Vandervor M, Van Steirteghem A. Controlled comparison of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Human Reprod* 1999; 14:2313-9.

10. Van der Westerlaken L, Naaktgeboren N, Verburg H, Dieben S, Helmerhorst FM. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes. *Fert Steril* 2006; 85: 395-400.
11. Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem A. Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 1:143-54.
12. Steassen C, Nagy Z., Lui J., (1995) One year's experience with elective transfer of two good quality embryos in the human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection programmes. *Hum Reprod* 1998; 10,3305-12
13. Ruiz A, Remohi J, Minguez Y, Guaness PP, Simon C, Pellicer A. The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fert Steril* 1998; 70: 1184-5
14. Steassen C, Camus M, Clasen K and Van Steirteghem., Conventional in vitro Fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in Sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Hum Reprod* 1999; 14,2474-9
15. Khamsi F, Yavas Y, Roberge S, Wong JC, Lacanna IC, Endman M. Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non-male factor: a prospective randomized study. *Fert Steril* 2001; 75: 342-7
16. Shveiky D, Simon A, Gino H, Safran A, Lewin A, Reubinoff B, Laufer N, Revel A. Sibling oocytes submission to IVF and ICSI in unexplained infertility patients: a potential assay for gamete quality. *Reprod Biomed Online*. 2006 Mar; 12(3): 371-4
17. Morton O., Tucker M., et al Reinsemination by intracytoplasmic sperm injection salvaging in-Vitro fertilization cycles after total or near total fertilization failure. *Fert Steril* 2000; 80:488-491

18. Yupze a., Lui Z., and Fluker M. Rescue intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes after complete conventional fertilization failure. *Fert Steril* 2000; 1115-19
19. Jaroudi K, Al-Hassan S, Al-Sufayan h, Al- Mayman H, Qeba M, Coskun S. Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization are complementary techniques in management of unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2003; 20:377-81
20. Tesarik J., Sousa M 1994 Human oocyte activation after Intracytoplasmic sperm injection . *Hum. Reprod.* 9,511-518
21. Tesarik J., Sousa M 1994 Comparison of Calcium responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by Intracytoplasmic sperm injection. *Fert. Steril.* 62, 1197-1204
22. Kastrop P., Weima S ., Kooij R., Velde . Comparison between in vitro Fertilization and Intracytoplasmic sperm injection with high insemination concentration after total fertilization failure in previous IVF attempt. *Human Reproduction.*, 1991, 6: 983-986
23. Asada Y., Baka H., et al Evaluation of the meiotic spindle apparatus in oocytes undergoing Intracytoplasmic sperm injection.. *Fert. Steril.* 1995., 65, 376-381
24. Blake m., Garrisi J et al (2000) Sperm deposition siteduring ICSI affects fertilization and development. *Fert. Steril.*73, 31-37
25. Dumoulin JCM, Coonen E, Bras M, van Wissen L, Ignoul-VanvuchelenR, Bergers-Jansen JM, et al. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional IVF or ICSI. *Hum Reprod* 2000; 15:402-9.
26. P.M.M. Kastrop, S.M Weima, R.J. Van Kooij and E.R. Te Velde. Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization (IVF) with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt. . *Human Reprod* 1999; 14:65-69.

27. T.A Griffinths, A.P Murdoch and M. Herbert. Embryonic development in vitro compromised by ICSI procedure. *Human Reprod* 2000; 15:1592-1596
28. Miller JE, Smnith TT. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Hum Reprod* 2001; 16:918-24
29. Yang D, Shahata MA, al-Bader M, al- Natsha SD, al- Flamerzia M, al-Shawaf T. Intracytoplasmic sperm injection improving embryo quality: comparison of sibling oocytes of non-male factor couples. *J. Assist Reprod Genet.* 1996 Apr; 13: 351-5.
30. Tournaye H, Verheyen G, Albano C, Camus M, Van Landuyt L, Devroey P, Van Sterirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection versus in-vitro fertilization: a randomized controlled trial and meta-analysis of the literature. *Fert Steril* 2002; 78: 1030-7
31. Paul E. Kihaille, Junichi Misumi, Keiko Hirotsuru, Yoko Kumasako, Ramzy E. Kisanga and Takafumi Utsunomiya. Comparison of sibling oocyte outcomes after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization in severe teratozoospermic patients in the first cycle. *International journal of andrology* 2003; 26: 57-62
32. Braude, P. Bolton, V.& Moore, S. Human gene expresión first occurs between the four- and eight- cell stage of preimplantation development. *Nature* 1988; 332: 459-461.
33. Fisch JD, Milki AA, Behr B. Sibling embryo blastocyst development correlates with the in vitro fertilization day 3 embryo transfer pregnancy rate in patients under age 40. *Fert Steril* 1999; 71: 750-2
34. Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Hamilton F, Meldrum D. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fert Steril* 1999; 72: 604-9.

35. Hwang JL, Seow KM, Lin YH, Hsieh BC, Huang LW, Chen HJ, Huang SC, Chen CY, Chen PH, Tzeng CR. IVF versus ICSI in sibling oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome: a randomized controlled trial. *Human Reprod* 2005; 20:1261-5.
36. Li Z, Lin H, Xiao W, Wang Y. Fertilization of IVF/ICSI using sibling oocytes from couples with subfertile male and unexplained infertility. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004;24: 365-8.
37. Jones GM, Trounson A, Lolatgis N, Wood C. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 70:1022-9.
38. Shoukir Y, Chardonnes D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 1998; 13: 1632-7.
39. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1999.
40. Lucette van der Westerlaken, Nico Naaktgeboren, Harjo Verburg, Sandra Dieben and Frans M. Helmerhorst. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen : a randomized study using sibling oocytes. *Fertility and Sterility* 2006; 85: 395-400
41. Simon Fishel, Irfan Aslam, Franco Lisi, Leonardo Rinaldi, Judy Timson, Merwyn Jacobson, Lawrence Gobetz, Steve Green, Alison Campbell and Rosella Lisi. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception?. *Human Reprod* 2000; 15:1278-1283.
42. Pisarska MD, Casson PR, Cisneros PL, Lamb DJ, Lipshultz LI, Buster JE, Carson SA. Fertilization after standard in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in subfertile males using sibling oocytes. *Fert Steril* 1999; 71: 627-32

43. Dumoulin JCM, Coonen E, Bras M, van Wissen L, Ignoul-Van vuchelen R, Bergers- Jansen JM, et al. Comparison of in vitro development of embryos originating from either conventinal IVF or ICSI. *Hum Reprod* 2000; 15:402-9.
44. Janny L, Menezo YJ. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod. Dev* 1994; 38: 36-42.
45. Jeziorowski T, Zech I, Vanderzwalmen P. Embryo development after ICSI and after standar IVF in sibling oovocytes from no male factor infertility patients. Abstracts of 18th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Vienna, Austria, 2002: 44.
46. Lisbet Van Landuyt, M.Sc., Anick De Vos, Ph.D., and Hubert Joris, and M.L.T., et al. Blastocyst formation in in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: Influence of fertilization procedure. *Fertility and Sterility* 2005; 83: 1397-1403.
47. Pisarska, M., Casson, P. R., Cisneros, P. L., Lamed. J. et al (1999) fertilization after estándar in vitro fertilization versus intractoplasmic sperm injection in subfertile males using sibling oocytes. *Fertility and Sterility* 1999; 71: 627-632.
48. Miller, K., Falcon, T& Goldberg, J. M.. Previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization is associated with poor outcome of ICSI. *Sterility* 1998; 69: 242 -245.
49. *Endocrinologia de la Reproduccion, Fisiologia, fisiopatologia y Manejo Clinico*. Samuel S.C. Yen, MD, Robert B. Jaffe, MD, Robert L. Barbieri, MD. 4ta. Edicion. Editorial; Medica Panamericana 2001.
50. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Leon Speroff, Robert Chang, P.L., Sauer, M. V. and Brown, S. (1999) Y chromosome micodeletion in a father and his four infertile sons. *Hum. Reprod.*, 14, 2689-2694.
51. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trialo of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13:3434-40.

52. Marek D, Langley M, Gardner D, Phil D, Confer N, Doody KM, et al. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1999; 72:1035-40.
53. Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, Lahloub TM, Ibrahim MH. Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2002; 77:114-8.
54. Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M. Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum Reprod* 2000; 15:1592-6.
55. Kihaille PE, Misumi J, Hirotsuru K, Kumasako Y, Kisanga RE, Utsunomiya T. Comparison of sibling oocyte outcomes after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in severe teratozoospermic patients in the first cycle. *Int J Androl* 2003; 26:57-62. Dumoulin JCM, Coonen E, Bras M, Bergers-Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen R,
56. Wissen L. Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. *Hum Reprod* 2001; 16:306-12.
57. Calderón, G., Belil, I., Aran, B., Veiga, A., Gil, Y., Boada, M., Martínez, F., Patera, N., Coroleu, B., Penella, J. *et al.* (1995) Intracytoplasmic sperm injection versus conventional *in vitro* fertilization: first results. *Hum. Reprod.*, **10**, 2835-2839.
58. Ménézo Y, Barak Y. Comparison between day-2 embryos obtained either from ICSI or resulting from short insemination IVF: influence of maternal age. *Hum. Reprod.* 2000; 15:1776-80.
59. Yang, D., Shahata, M.A., Al-Bader, M *et al.* (1996). Intracytoplasmic sperm injection improving embryo quality: comparison of sibling oocytes of non-male factor couples. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 13, 351-355
60. Braude, P. Bolton, V. & Moore, S. (1998). Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stage of preimplantation development. *Nature* 332, 459-461.