



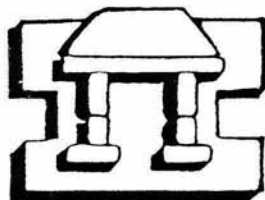
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**PROYECTO: TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN
ASISTIDA**

T E S I N A
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JESÚS CÓRDOVA NÚÑEZ

ASESOR: M. en C. RODOLFO CARDENAS REYGADAS



IZTACALA

TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX.

2003.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**“Los deseos de nuestra vida
forman una cadena , cuyos
eslabones son las
esperanzas”**

Lucio Anneo Séneca

Reconocimientos.

Esta tesina no la escribí solo, me tarde un poco, pero como siempre tuve los deseos y como mientras hay vida hay esperanza, pues finalmente la termine.

A mis padres:

José Córdova Osorio y Ma .Antonieta Núñez.

No tengo más que palabras de agradecimiento por su fe, amor y apoyo para conmigo, los amo mucho y agradezco a Dios que ellos sean mis padres.

A mi esposa:

Cecilia: Le agradezco el apoyo incondicional que me ha dado en todo este proceso y en todo el proceso de vida marital y gracias ha ella he logrado lo que he logrado, gracias mi amor.

A mi hermana:

Guadalupe Córdova: Que aunque estemos lejos ella sabe que siempre la tengo presente y que la quiero mucho.

A mis hijos: Mariana, Edgar y Mauricio:

Estoy muy orgulloso de que ustedes sean mis hijos y espero que esto les sirva de aliciente y que yo los pueda ver realizados. Siempre tengan sueños , luchen y trabajen para lograrlos... Los amo.

Quiero Agradecer a todos los que de alguna manera me han apoyado a lo largo de mi vida, que no menciono por temor de omitir a alguien ,pero quiero hacer una mención muy especial al **Dr.Jesús Barrón Vallejo** que desde que lo conozco solo he recibido amistad, conocimiento y apoyo y además de aceptar ser mi asesor externo en este trabajo. Y también al **M en C.Rodolfo Cárdenas Reygadas** por apoyarme , creer en la tesina, su paciencia y ser mi asesor en este trabajo. A todos muchas gracias.

INTRODUCCIÓN	6
ASPECTOS HISTORICOS TRASCEDENTALES	7
CRONOLOGIA	10
ANTECEDENTES	16
ACTUALIDADES EN TECNICAS DE REPRODUCCION	
ASISTIDA	16
INHIBICIÓN DE LA FUNCION GONADAL	18
HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA	19
CAPTURA OVULAR	21
PROCESO DE FERTILIZACION PROPIAMENTE DICHO	22
TRANSFERENCIA DE PRE-EMBRIONES	25
SUPLEMENTO DE LA FASE LUTEA	25
CORROBORACION DE LA EXISTENCIA DE EMBARAZO	26
TRANSFERENCIA INTRATUBARIA DE GAMETOS	27
FERTILIZACION ASISTIDA	29
ICSI	31
ASPECTOS TECNICOS	32
MICROMANIPULADORES	33
MICROHERRAMIENTAS	33
OBJETIVO	34
METODOLOGIA	34
OBTENCIÓN DE ESPERMAS DESDE BIOPSIA TESTICULAR ..	35
PREPARACION DE OVOCITOS PARA ICSI	36
PROCEDIMIENTO DE ICSI	39
CONCLUSIÓN	45
BIBLIOGRAFÍA	45

INTRODUCCION.

La incapacidad para concebir se presenta de una manera sorpresiva en la mayoría de los hombres y las mujeres, muchos de los cuales asumen que el embarazo sucederá inmediatamente después de suspender el control de la natalidad. En la mayoría de los casos el embarazo ocurre sin dificultad, sin embargo, alrededor del 10% al 15% de las parejas se enfrentan a la infertilidad (1).

En sus esfuerzos para superar la infertilidad, muchas parejas concebirán a través de tratamientos de infertilidad como los medicamentos para corregir las dificultades ovulatorias o cirugía para corregir problemas anatómicos. Para algunas parejas, la solución puede requerir de procedimientos médicos más complicados. Existen diversos tratamientos especializados diseñados para aumentar el número de óvulos y/o espermatozoides, o para reunirlos. De manera colectiva, estos procedimientos médicos se refieren a las técnicas de reproducción asistida (ART) (1).

Las (ART) ofrecen una esperanza para las parejas quienes no pueden lograr embarazarse a través de otros medios.

Durante un mes determinado, la posibilidad de lograr un embarazo para una pareja fértil normal es de cerca del 25% (1). Con el uso de los procedimientos de las ART, ciertas parejas infértiles cuentan con una posibilidad de embarazo similar a la de una pareja normal. Los procedimientos

de las ART han dado como resultado índices de embarazo que van desde el 18% al 28% por recuperación del óvulo (2).

En algunos casos, el éxito puede requerir de constantes intentos antes de que la concepción pueda ocurrir. Sin embargo, esto es cierto incluso en parejas quienes no experimentan problemas de fertilidad.

La fertilización in vitro (In Vitro Fertilization, IVF) sigue siendo el procedimiento de las ART utilizado con más frecuencia; Sin embargo, los procedimientos de las ART han progresado desde la IVF para incluir varios métodos tales como la transferencia intratubaria de gametos (GIFT) y la transferencia intratubaria de cigotos (ZIFT). Contrario a la creencia popular, la mayoría de los procedimientos de las ART ya no son considerados de investigación o experimentales, si no tratamientos médicos establecidos para la infertilidad (3 y 4).

Aspectos históricos trascendentales.

Los intentos iniciales para realizar procedimientos de Reproducción Asistida datan de 1890 cuando Heape obtuvo embriones de las salpinges de conejos y los transfirió a otros animales; obteniendo embarazos totalmente normales.(29)

En 1944 J. Rock y M. Menkin realizaron los primeros intentos de fertilización in vitro en humanos, en esa época se obtuvo desarrollo embrionario incipiente. Hacia el año 1955 Shettles fue capaz de llevar el crecimiento embrionario humano hasta la etapa de mórula (32 blastómeras).

El primer reporte exitoso de fertilización in vitro en animales fue reportado por (Chang, 1959). Su trabajo consistió en la fertilización artificial

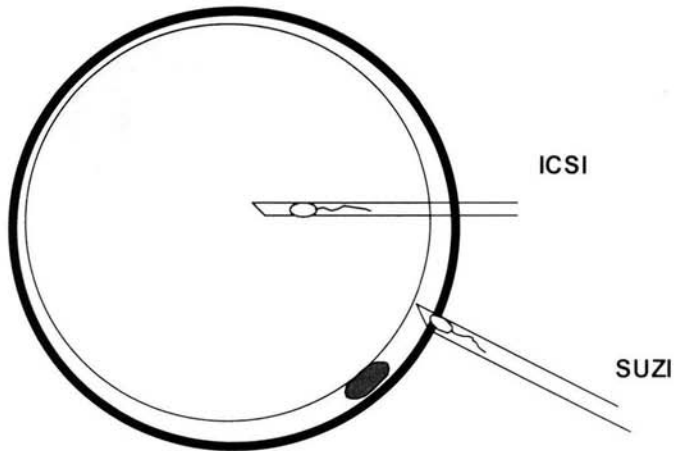
de óvulos de conejo con espermatozoides capacitados en el laboratorio, con la transferencia ulterior de los preembriones; obteniéndose conejos normales.

Los trabajos que llevaron a la época exitosa de la fertilización in vitro datan de 1963 fueron iniciados por Robert G. Edwards. El mismo Edwards y Patrick Steptoe reportaron en 1976 el primer embarazo obtenido mediante fertilización in vitro, no obstante, se trató de una gestación ectópica (en la trompa de Falopio).(29)

Las técnicas de reproducción asistida se establecieron definitivamente en el año de 1978 con el nacimiento del primer bebé, Louise Joy Brown, como resultado de la fertilización in vitro (IVF).(29)

Los primeros intentos de fertilización in vitro fueron realizados en ciclos ovulatorios espontáneos, en 1981 se introdujo el uso de medicamentos para producir ovulación múltiple (citrate de clomifeno y menotropinas) por G. Jones.

En el año 1984 se dio a conocer un nuevo procedimiento de Reproducción Asistida, la transferencia intratubaria de gametos, efectuada por vía laparoscópica por el Dr. Ricardo Asch y J. Balmaceda. En esta modalidad de tratamiento se extraen los óvulos, se mezclan con los espermatozoides y son introducidos a las salpinges (trompas de Falopio). (29)



Técnicas de Micromanipulación de Gametos.

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se utilizó por vez primera en (1992), fue introducida por Palermo y colaboradores. El procedimiento consiste en la introducción de una célula germinal masculina en el interior del óvulo. Es una variante de la técnica de SUZI (en la que el esperma es colocado en el espacio perivitelino, por debajo de la zona pelúcida). Estos procedimientos son utilizados cuando existe alteración importante de las características seminales (trastornos en la cuenta, movilidad y morfología espermáticas).(11)

En nuestro país los primeros intentos de Reproducción Asistida fueron efectuados por los doctores Samuel Hernández Ayup y Alfonso Gutiérrez Nájjar en las ciudades de Monterrey y México D.F. Actualmente ambos dirigen centros de donde se realizan cotidianamente un gran número de procedimientos para el manejo de esterilidad.(29)

Cronología.

- **1674 -1677.** A van Leewenhoek y Hamen describen las características microscópicas de los espermatozoides.(9)
- **1759.** Karl Freidrich Wolf publica *Theoria generationes*. Inicio de la Embriología.(9)
- **1785.** John Hunter. Realiza la primera inseminación artificial, usando semen del esposo de la paciente. El procedimiento se hizo debido a que el varón presentaba hipospadias.(9)
- **1827.** Karl Ernst von Baer fue el primero en describir los óvulos de los mamíferos.(23)
- **1866.** Son publicados los trabajos de Gregor Mendel (“Padre de la Genética”), pero tienen repercusión en el ámbito científico hasta el año 1900.(5)
- **1884.** Pancoast efectúa la primera inseminación con semen de donador.
- **1894.** Nace Aldous Leonard Huxley. Visionario de la Reproducción Asistida, autor de “Brave New World” (“Un Mundo Feliz”). Describe anticipadamente situaciones como la fertilización in vitro, eugenesia y clonación (“proceso Bokanovsky”). Los hechos se desarrollan aproximadamente en el siglo XXV (~ del año 630 de la era “Fordiana”).
- **1910.** Rindfleisch reporta la técnica de la histerosalpingografía.
- **1921.** Achard y Thiers describen por primera vez la relación entre hiperandrogenismo y alteraciones del metabolismo de la glucosa.
- **1927.** Sampson.J.A. Enuncia la teoría de la menstruación retrógrada como causa de la endometriosis (Peritoneal endometriosis due to the

menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol 1927; 14: 422).

- **1934.** Pinkus G. y Enzmann E.V. Logran la fertilización in vitro de gametos de conejos, se obtiene el embarazo y siete productos después de la transferencia de los embriones (Can mammalian eggs undergo normal development in vitro? Proc Natl Acad Sci USA 1934; 20: 121-122).
- **1935.** Irving F Stein y Michael L Leventhal realizan la primera descripción del síndrome de ovarios poliquísticos (Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol 1935; 29: 181-191).
- **1939.** IF Stein y MR Cohen usan la resección en cuña de los ovarios para inducción de la ovulación (Surgical treatment of bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol 1939; 38: 465-480).
- **1938-1949.** Jahnel y Polge desarrollan las técnicas iniciales de criopreservación de semen.
- **1944.** J Rock y M Menkin reportan el primer intento de fertilización in vitro con gametos humanos. Obtuvieron los gametos mediante laparotomía, trabajo publicado por autores de gran renombre y en una revista reconocidísima, no obstante, aceptado con gran escepticismo (In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. Science 1944; 100: 105-107).
- **1947.** Piero Donini, fundador del laboratorio Serono; desarrolla el proceso de extracción de gonadotropinas (menotropinas) de la orina de pacientes postmenopausicas.

- **1949.** El papa Pío XII desaprueba la inseminación con semen de donador.
- **1950.** RW Noyes, AT Hertig y J Rock publican su artículo histórico sobre etapificación del ciclo endometrial. El trabajo inauguró la revista *Fertility and Sterility*. Inicio de la era científica del estudio y tratamiento de la esterilidad (*Dating the Endometrial Biopsy. Fertil Steril 1950; 1: 3-25*).
- **1953.** Rakoff intenta inducir la ovulación irradiando la hipófisis y los ovarios.
- **1953.** James D. Watson y Francis HC Crick determinaron la estructura del DNA.
- **1953-1954.** Bunge y Sherman publican el logro de embarazos usando semen previamente criopreservado.
- **1955.** Shettles desarrolla preembriones humanos hasta la etapa de mórula (aproximadamente 32 células).
- **1962.** Premio Nóbel de Fisiología y Medicina para James D Watson y Francis HC Crick por haber determinado la estructura del DNA.
- **1964.** Sherman introduce el uso de nitrógeno líquido para la preservación de semen.
- **1968.** Inicio del PGD en modelos animales (Gardner RL, Edwards RG. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature 1968; 218: 346-348*).
- **1968.** Primer reporte que asociaba la fibrosis quística con infertilidad masculina (Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclaw DS. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med 1968; 279: 65-69*).

- **1971.** Andrew V Schally (prospecto de futbolista profesional y químico), trabajó en México en el Instituto Nacional de la Nutrición en los años 60's (realizó trabajos sobre hormonas hipotalámicas). Junto con Roger Guillemin aísla la GnRH. Trabajo merecedor del Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en 1977.
- **1976.** Tiepolo L.zuffardi O. Postulan la existencia de genes en el cromosoma Y que regulan la espermatogénesis, son descritas las deleciones (Azoospermia factor, región AZF) del brazo largo del mismo cromosoma (Tiepolo L, Zuffardi O. Lacialization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromromosome long arm. Hum Genet 1976; 38: 119).
- **1978.** Nace en la Gran Bretaña el primer niño vivo concebido mediante fertilización in vitro (Louise Joy Brown). La gestante desarrolló preeclampsia y hubo retardo en el crecimiento intrauterino, el producto fue obtenido mediante cesárea. Es un logro trascendental en la historia de la Medicina y de la Humanidad, debido a los trabajos de varios años de Patrick C. Steptoe y Robert G. Edwards. Se inicia la era moderna de la Reproducción Asistida (Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 1978; Aug 2; 366).
- **1983.** J Tesarik publica antes que Asch y Balmaceda el éxito de la transferencia intratubaria de gametos. Esta modalidad fue efectuada mediante laparotomía (Oocyte recovery, in vitro insemination, and transfer into the oviduct after its microsurgical repair at a single laparotomy. Fertil Steril 1983; 39: 472-475).
- **1984.** Ricardo Asch y José Balmaceda reportan la técnica de transferencia intratubaria de gametos por vía laparoscópica (GIFT).

(Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. Lancet 1984; Nov 2: 1034-1035).

- **1984.** P Lutjen publica el primer nacimiento con donación de óvulos (The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. Nature 1984; 307: 174-175).
- **1984.** GH Zeilmaker y colaboradores tienen éxito con la transferencia de embriones previamente criopreservados (Two pregnancies following transfer of intact frozen-tawed embryos. Fertil Steril 1984; 42: 293-296).
- **1985.** WH Utian y colaboradores obtienen el primer embarazo exitoso con la transferencia de embriones a una madre subrogada (Successful pregnancy after in vitro fertilization and embryo transfer from an infertile woman to a surrogate. N Engl J Med 1985; 313: 1351-1352).
- **1985.** Wikland describe la aspiración transvaginal de los folículos ováricos. La obtención de óvulos utilizando el ultrasonido desplaza a las técnicas endoscópicas.
- **1986-1988.** La American Fertility Society, AFS (Actualmente American Society of Reproductive Medicine, ASRM); establece las normas para la congelación de semen y hace necesario el guardar un período obligatorio de cuarentena durante 180 días.
- **1989.** Se sintetiza con éxito la FSH recombinante usando ovario de hamster chino por Lab.Serono Internacional.
- **1990.** Inicio del Diagnóstico genético preimplantación (Preimplantation Genetic Diagnosis. PGD) en seres humanos, es realizado el diagnóstico preimplantación del sexo del preembrión mediante PCR. El trabajo

original detectó secuencias específicas del DNA en el cromosoma Y (Handyside AH, Kontogianni EH, Ardi K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-770).

- **1992.** Primer reporte de embarazos obtenidos con la técnica de ICSI. (Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-18).
- **1993.** KB Mullis recibe el premio Nobel de Química por el desarrollo de la técnica de PCR Los trabajos iniciales datan de 1985.
- **1997.** Producción de ovejas a partir de células mamarias de animales adultos. (Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 395: 810-813). Inicio de la controversia sobre clonación.
- **1997.** Primer reporte de producción de primates mediante la técnica de transferencia nuclear (Meng L, Ely JJ, Stouffer RL, Wolf DP. Rhesus Monkeys Produced by Nuclear Transfer. *Biol Reprod* 1997; 57: 454-459).
- **2002.** El almacenamiento de sangre del cordón umbilical es una realidad clínica cotidiana.
- **2002.** Actualmente en marcha el proyecto del genoma humano.
- **2002.** Actualmente prohibida la clonación de seres humanos.

Antecedentes.

Actualidades en técnicas de Reproducción Asistida.

Las técnicas de Reproducción Asistida se definen como aquellos procedimientos en los cuales se realiza manipulación de los óvulos, de los espermatozoides o de ambos con el propósito de incrementar las posibilidades de que una pareja logre el embarazo. En términos generales pueden dividirse en dos grandes grupos.(6)

Indicaciones para efectuar fertilización in vitro

- Lesión irreversible de las salpinges.
- Factor masculino.
- Anovulación crónica en la que no se han logrado resultados con otros tratamientos.
- Donación de óvulos.b
- Madre subrogada.

Corroboran la fertilización	No corroboran la fecundación
Fertilización <u>in vitro</u> .	Inseminación. <ul style="list-style-type: none">• Semen del esposo.• Semen de donador.
Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).	Transferencia intratubaria de gametos (GIFT).
Transferencia intratubaria de cigotos (ZIFT).	
Transferencia tubaria de embriones (TET).	

La fertilización in vitro fue desarrollada inicialmente para el tratamiento de pacientes que presentaban lesión irreversible de las salpinges. Actualmente se aplica en una gran cantidad de situaciones reproductivas.(12)

Existe un protocolo general para evaluar a las pacientes y luego para realizar la fertilización in vitro, generalmente puede realizarse en el curso de un solo ciclo menstrual. (15)

Evaluación de la pareja a la que se le va a realizar fertilización in vitro

MUJER

- Hormona foliculo estimulante, hormona luteizante, estradiol y prolactina séricos en fase folicular temprana.
- Progesterona sérica en fase lútea.
- Cultivo cervicovaginal (Incluyendo búsqueda de Chamydia y Mycoplasma).
- Biometría hemática, tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina, virus de la inmunodeficiencia humana.
- Evaluación de la cavidad uterina mediante histerosalpingografía o histeroscopia.

VARON

- Espermatobioscopia directa.
 - Espermocultivo (Incluyendo búsqueda de Chamydia y Mycoplasma).
 - Virus de la inmunodeficiencia humana.
-

Hay una forma general para realizar la fertilización in vitro y que se aplica en gran medida a los otros procedimientos de Reproducción Asistida.

Fases del procedimiento de fertilización in vitro.

- Inhibición de la función gonadal.
 - Hiperestimulación ovárica controlada.
 - Captura ovular.
 - Fertilización propiamente dicha.
 - Transferencia de los preembriones.
 - Suplemento de fase lútea
 - Corroboración del embarazo.
-

Inhibición de la función gonadal.

Esta fase del procedimiento puede hacerse con dos tipos de medicamentos, agonistas o antagonistas de la GnRH.

1. El esquema largo (“Down Regulation”) de administración de agonistas de GnRH se inicia siete días antes de que comience el ciclo menstrual en el que se va a realizar el procedimiento (fase lútea media previa), es el más frecuentemente empleado en la práctica clínica cotidiana. Habitualmente la dosis del medicamento se reduce a la mitad cuando la paciente inicia la aplicación de las gonadotropinas. Con el acetato de leuprolide se usa inicialmente 1.0 mg y luego la posología se reduce a 0.5 mg; en el caso del acetato de nafarelina la dosis se modifica de 0.4 mg a 0.2 mg. El agonista de GnRH se aplica hasta el día de administración de la hCG.
2. El esquema corto (“Flare up”) se inicia el día en que la paciente empieza a usar las gonadotropinas, habitualmente se emplea en pacientes que son malas para responder o que se encuentran cerca de los

40 años. Generalmente la dosis de acetato de leuprolide es de 0.5 mg y la de acetato de nafarelina es de 0.2 mg. Con este esquema el agonista también se usa hasta el día de la aplicación de la hCG.(15)

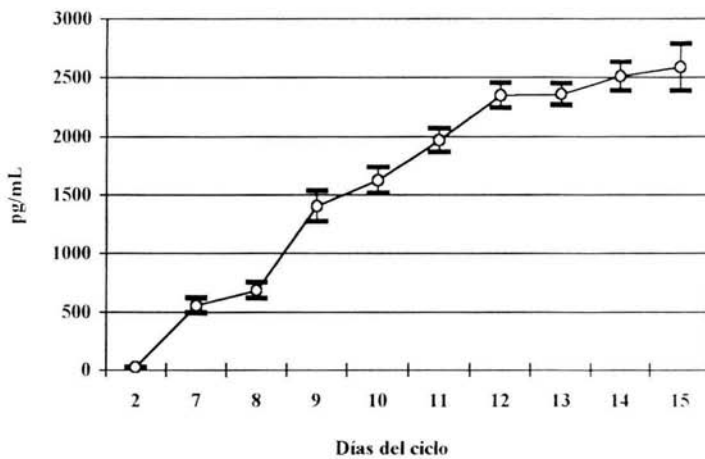
Hiperestimulación ovárica controlada (HOC).



Evaluación ultrasonográfica de la hiperestimulación ovárica controlada.

Inicialmente la fertilización in vitro se efectuaba sin el uso de inductores de la ovulación, esa práctica ha caído casi totalmente en desuso. La HOC en fertilización in vitro puede hacerse con gonadotropinas urinarias o recombinantes. La dosis promedio recomendada por es de 300 UI/día desde el día tres del ciclo. Puede usarse cualquiera de los preparados.(4)

Valores habituales de estradiol serico



El seguimiento de la HOC se hace con ultrasonido transvaginal y mediante determinaciones de estradiol sérico. Habitualmente la paciente se cita en el día dos de su ciclo y se le toma un ultrasonido en el que se deben observar los dos ovarios quiescentes, la medición de estradiol sérico debe ser menor de 20 pg/mL.(4)

La HOC para fertilización in vitro citando nuevamente a las pacientes en el día 8 del ciclo. Para ese día debe de haber folículos de 10-12 mm de diámetro y los valores de estradiol sérico deben ser de 500-700 pg/mL. A partir del día 8 del ciclo la evaluación de la paciente se hace cada 2-3 días.(4)

La hCG es administrada cuando el folículo dominante alcanza un diámetro de 16 mm, siendo realizada la captura ovular 34 horas después de dar el medicamento. El criterio para cancelar un ciclo de HOC es que los niveles de estradiol sean mayores de 3000 pg/mL o que la paciente tenga más de 20 folículos con diámetro mayor a 10 mm.(4)

Captura ovular.

Esta parte de la técnica se efectúa por vía vaginal mediante aspiración con una aguja guiada por la imagen de un ultrasonido. Habitualmente se usa propofol o midazolam o una combinación de ambos. Es una sedación similar a la que se usa para realizar un procedimiento ginecológico ambulatorio. No se requiere que la paciente sea hospitalizada, ya que es dada de alta aproximadamente dos horas después de realizada la captura.(8)



Representación esquemática de la captura ovular.

Proceso de fertilización propiamente dicho.

El mismo día de la captura se debe contar con los espermatozoides. La muestra seminal habitualmente se obtiene por masturbación, pero hay casos especiales de pacientes azoospermicos que quieren realizar la fertilización in vitro con sus propios gametos. En estos casos es posible aplicar técnicas especiales para la obtención de células germinales masculinas a saber. (16)

1. MESA. Aspiración microquirúrgica de espermatozoides del epidídimo (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration). Con esta técnica se hace una exploración bajo anestesia del epidídimo y son extraídas las células germinales, está muy conspicuamente indicada en pacientes con

antecedente de vasectomía que no pudo ser corregida o con ausencia congénita bilateral de los conductos deferentes.

2. PESA. Aspiración percutánea de espermatozoides del epidídimo (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration). Es una variante de la técnica de MESA (menos onerosa y molesta), aquí se usa una aguja de 19-g para efectuar la aspiración a ciegas del líquido contenido dentro del epidídimo.
3. TESE. Extracción testicular de espermatozoides (Testicular Sperm Extraction). Consiste en la obtención de espermatozoides por biopsia directa del parénquima testicular. Está indicada en pacientes con azoospermia no obstructiva que tienen células germinales en los túbulos seminíferos (v.g. casos con microdeleciones del cromosoma Y que tienen grados importantes de reducción de la espermatogénesis).
4. TESA. Aspiración testicular de espermatozoides (Testicular Sperm Aspiration). En esta técnica se realiza la aspiración del parénquima testicular con aguja fina (21-g). Tiene la ventaja de ser realizada con anestesia local, el número de células germinales que se obtienen puede ser muy restringido. Tiene indicaciones similares a la TESE. (16)

Después de la captura los óvulos se mantienen en incubación durante 4 - 6 horas y posteriormente son inseminados convencionalmente o sometidos al procedimiento de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En la fertilización in vitro habitual los gametos se colocan en medio de cultivo bajo aceite mineral. El medio de cultivo más usado en estos casos es el HTF (Human Tubal Fluid). Las condiciones de incubación se controlan estrictamente: la temperatura es mantenida ~ 37.0 °C, la presión parcial de

CO₂ al 5% con un capnógrafo automático y la humedad relativa se modula al 98%. (21)

**Indicaciones para efectuar el
procedimiento ICSI**

- Factor masculino severamente alterado.
 - Falla en la fertilización en un ciclo previo.
 - Falla en la fertilización durante el mismo ciclo de tratamiento.
 - Se dispone de pocos óvulos (tres o menos).
 - En todos los casos de fertilización *in vitro*.
-

Existe una clasificación de los preembriones basada en características totalmente morfológicas.

Grado 1. Preembriones con blastómeras de igual tamaño, sin fragmentos citoplasmáticos.

Grado 2. Las blastómeras son igual tamaño, fragmentos citoplasmáticos pequeños o con la presencia de burbujas en el citoplasma.

Grado 3. Existen blastómeras de tamaño diferente, con fragmentos citoplasmáticos escasos.

Grado 4. Independientemente de las características de las blastómeras, hay fragmentación celular más avanzada.

Grado 5. Fragmentación muy extensa de las blastómeras.(26)

Transferencia de los preembriones.

La transferencia de los preembriones habitualmente se hace 48-72 horas después de la captura ovular. Empero, existe actualmente tendencia a realizar la transferencia en etapas tardías del proceso de segmentación (día 5 postcaptura). La transferencia tardía tiene como ventaja que se introduce al útero un número pequeño de embriones (uno o dos blastocistos) de excelente calidad y que tienen muy altas posibilidades de implantarse exitosamente.(27)

Características idóneas del procedimiento de transferencia.

- Atraumática.
 - Siempre precedida de una prueba de transferencia.
 - Preferentemente guiada mediante ultrasonido.
-

Suplemento de fase lútea.

Habitualmente se realiza con la administración exclusiva de progesterona, puede hacerse por varias vías.

La vía intramuscular es la más utilizada en la práctica clínica, la dosis habitual es de 50-100 mg/día; el medicamento se inicia el día de la captura ovular. La absorción del medicamento es muy buena. Si la paciente logra el embarazo, el suplemento se continúa durante el primer trimestre de la

gestación. El inconveniente práctico de esta vía de administración es que su uso resulta muy doloroso conforme va transcurriendo el tratamiento.(25)

Formas de administrar el suplemento de fase lútea.

- Oral.
 - Intramuscular
 - Gel vaginal.
 - Supositorios vaginales.
-

La vía de administración vaginal ha demostrado ser tan eficaz como la aplicación intramuscular, produce concentraciones séricas fisiológicas y la cercanía con el endometrio da origen a altos niveles tisulares en las células endometriales.(25)

El suplemento de la fase lútea también puede hacerse con gonadotropina coriónica humana. No obstante, este esquema tiene dos inconvenientes. Primero, incrementa la duración y la intensidad del síndrome de hiperestimulación ovárica. Luego, puede usarse con fines no médicos ya que ocasiona que las pruebas de embarazo den resultados espurios.(25)

Corroboración de la existencia del embarazo.

Se realiza la determinación de subunidad beta de gonadotropina coriónica en sangre dos semanas después de la transferencia de embriones. En caso de resultar positiva se practica un ultrasonido transvaginal tres semanas después para corroborar vitalidad y el número de embriones implantados.(1)

La transferencia intratubaria de Gametos.

En el procedimiento de transferencia intratubaria de gametos. (Gamete intrafallopian transfer, GIFT) los óvulos y espermatozoides son colocados en la ampulla de la salpinge; donde normalmente ocurre la fecundación.

En pacientes con salpinges permeables, el GIFT produce tasas de embarazo superiores a las pacientes que son tratadas mediante fertilización in vitro; no obstante, su inconveniente práctico es la necesidad de realizar un procedimiento invasivo.(27)

Evolución obstétrica de las pacientes que tuvieron éxito con el tratamiento.

El embarazo múltiple es una de las eventualidades que pueden ocurrir con los tratamientos de la infertilidad. Independientemente de que la gestación múltiple sea espontánea o se presente después de algún procedimiento, ya tiene implicaciones peculiares.(2)

Morbilidad relacionada con el embarazo múltiple.

- Prematurez.
 - Retardo en el crecimiento intrauterino.
 - Ruptura prematura de membranas.
 - Mayor frecuencia de diabetes gestacional.
 - Aumento en la frecuencia de hipertensión inducida por el embarazo.
-

Muy importante, desde el punto de vista del autor; en los embarazos con feto único el antecedente de esterilidad y el uso de Técnicas de Reproducción Asistida no son factores que le den riesgo al embarazo. El tratamiento con fertilización in vitro no es indicación para efectuar cesárea.(1)

FERTILIZACION ASISTIDA. LABORATORIO DE GAMETOS.

Técnicas, aplicación y consecuencias.

El estándar de una fertilización in vitro (IVF), es de aproximadamente 50 a 100,000 espermias móviles/mL, para que los ovocitos sean fecundados.



Preembrión en etapa de pronúcleos.

Una simple aproximación a la fertilización asistida es incrementar el número de espermias usados para inseminar el ovocito, y tener más probabilidad de una fertilización. Los espermias se pueden concentrar por centrifugación y usarse para inseminación y poder lograr (varios millones/mL) de concentración (1),(2) y (3). Los espermias pueden ser tratados con agentes

farmacológicos semejantes a las pentoxifilinas para enlazar la motilidad espermática y su función (4), (5) y (6).

Uno de los desafíos de los laboratorios de embriología y andrología es determinar cuando es necesario realizar un procedimiento como el ICSI y cuando una simple IUI. Por lo que hay una rigurosa evaluación de los varones, que incluye estudio de la función espermática, por lo que se tienen que seleccionar bien los pacientes para realizar el procedimiento de ICSI (7). En muchos varones, sin embargo, los parámetros de semen están severamente afectados por alteraciones en la concentración y se requiere un procedimiento más sofisticado como : inserción del espermatozoide en la zona pelúcida (SUZI), disección en la zona parcial del ovocito (PZD) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). (14)

Los conceptos de (PZD) y (SUZI) son similares. En ambas terapias la finalidad es evitar la necesidad para que el espermatozoide penetre la zona pelúcida del huevo durante la fertilización. La zona pelúcida es un saco de glicoproteína que rodea el ovocito y puede amarrar y penetrar para efecto de la fertilización. La incapacidad del espermatozoide para llevar a cabo la fertilización es un fracaso con el (PZD), un pequeño corte hecho con el uso de un micromanipulador, el huevo es entonces inseminado y el espermatozoide puede penetrar a través de la brecha y contactar directamente la membrana plasmática del óvulo.(14)

En el (SUZI) varios espermatozoides (generalmente de 2-10) son aspirados dentro de la micropipeta y son inyectados directamente entre la membrana

vitelina y de la membrana plasmática del huevo. En ambos (SUZI) y (PZD), el espermatozoide necesita solo fundirse con la membrana plasmática para penetrar al huevo, las tasas de fertilización son de 15 – 20%, se han llevado a cabo en pacientes que han tenido intentos fallidos en técnicas de fertilización o en aquellos parámetros del semen que se ven severamente afectados para realizar una IUI. Sin embargo estas técnicas han sido desplazadas por el ICSI. (15)

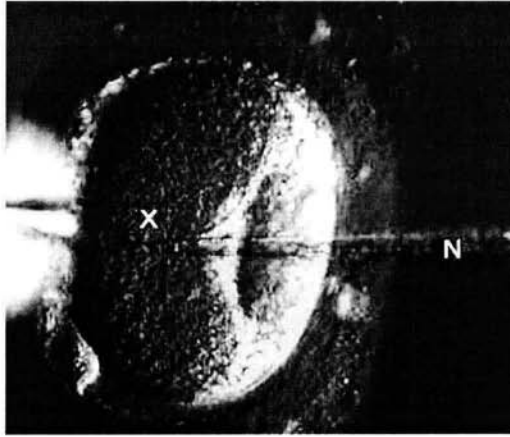
ICSI (Inyección intracitoplasmática del espermatozoide).

El ICSI ha revolucionado el tratamiento de factor masculino severo. En este procedimiento las técnicas de micromanipulación son usadas para inyectar un solo espermatozoide directamente dentro del citoplasma del ovocito para llevar a cabo la fertilización (8).

Lanzendorf y cols en 1955. Realizaron la primera evidencia con huevos humanos que pudieron ser inyectados con espermatozoide y llegaron hasta la formación pro-nuclear.

Palermo y Cols en 1992 ; Reportaron el primer nacimiento usando ICSI. El uso del ICSI rápidamente suplantó otras técnicas como el SUZI, varios estudios mostraron que mejoraron las tasas de fertilización usando ICSI que SUZI (9), (10) y (11).

El ICSI ha llegado a ser la mejor técnica en reproducción asistida.



Procedimiento de ICSI.

ASPECTOS TÉCNICOS.

A lo largo del desarrollo del ICSI, los científicos han empleado equipos de micromanipulación para diferentes aplicaciones clínicas.

Cuando se selecciona el microscopio para el ICSI muchos factores deben ser considerados. El microscopio invertido es la mejor opción para la micromanipulación ya que los objetivos del microscopio se pueden acercar sin problema a la caja de petri por debajo de la misma, de esta manera hay menor distancia para trabajar con los lentes y la caja de petri. Es más fácil mover de lugar la caja de petri en un microscopio invertido.(11)

El microscopio invertido da un efecto de tercera dimensión cuando se observan los gametos. En el ICSI esto es muy importante ya que se tiene que

alinear la posición de la aguja en el centro del ovocito , se puede ver con mucha claridad el procedimiento y por lo tanto se da una menor probabilidad de daño al ovocito y la fertilización sería óptima.(17)

MICROMANIPULADORES.

El objetivo de los micromanipuladores es trabajar con una excelente exactitud en sus movimientos a nivel micro.(10)

Si bien ninguna técnica embrionaria puede mover embriones o remover la corona celular, ninguna tecnología es capaz de sostener un ovocito inmóvil el suficiente tiempo para insertarle una pipeta con un espermatozoide e introducirlo en el citoplasma, los micromanipuladores ofrecen la habilidad de manipular con suficiente facilidad los ovocitos, el espermatozoide y los embriones. En el ICSI es importante que el cuerpo inmovilizado del ovocito y el espermatozoide inyectado, requieren de movimientos precisos para optimizar los resultados.(10)

MICRO-HERRAMIENTAS.

Uno de los más importantes aspectos de cualquier proceso de micromanipulación es la calidad de las micro-herramientas usadas. En general, pipetas usadas para el ICSI deben tener un bisel con un ángulo de 30 – 50° y un diámetro externo e interno no mayor de 7 a 5 micrómetros (11).

Es recomendable que el diámetro de la aguja o pipeta no debe ser mayor al tamaño del ovocito. El sujetador de la pipeta necesita ser seguro durante el

procedimiento, debe haber una abertura perpendicular a lo largo de la pipeta y diámetros de 50 a 80 micrómetros.(11)

Objetivo.

Describir las técnicas de reproducción asistida ,como una realidad en nuestro tiempo y como una posibilidad de tener hijos en parejas infértiles.

METODOLOGIA.

PREPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES PARA ICSI.

Se diluye la muestra de semen 1:1 con medio de cultivo y se centrifuga por 7 minutos a 300g, se aspira el sobrenadante hasta dejar 2 ml de semen concentrado, se evalúa la motilidad y concentración espermática . Se prepara en un tubo de centrifuga 3 gradientes de Percoll (95,70 y 50 %) si la muestra contiene menos 5 Millones/mL y motilidad A + B del 40%, o preparar 2 gradientes (80 y 40%) si la muestra contiene menos de 5 Millones/mL El volumen de los diferentes gradientes de Percoll debe ser de 0.6 ml.(12)

Se coloca sobre el gradiente de menor concentración (50 ó 40 %) no más de 1 mL de la muestra de semen.,se vuelve a centrifugar a 300 g por 20', se aspira el gradiente de mayor concentración junto con el pellet o botón y se coloca en un tubo de centrifuga con 5 mL de medio de cultivo, no se

descartan los gradientes y se centrifuga 2 veces consecutivas a 500g por 7' y se resuspende el pellet en 0.2 ml de medio de cultivo.(12)

Si no se encuentran espermatozoides, aspirar la interfase de las gradientes 90-70% ó 80-40%, donde es posible encontrar espermatozoides con algún grado de motilidad. Resuspender esta fracción en medio de cultivo y lavarla 2 veces por centrifugación a 500g por 7'. Se ajusta la concentración final a no más de 1 millón de espermatozoides/mL y mantenerla en incubadora a 37°C hasta el momento del ICSI Palermo y cols. En 1992

OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DESDE BIOPSIA TESTICULAR.

Una vez obtenidas las muestras de la biopsia testicular, éstas se colocan en una caja petri conteniendo 2 ml de medio de cultivo tamponado con buffer Hepes. La liberación de los espermatozoides de los túbulos seminíferos se realiza por dos portaobjetos estériles. Uno se usa para mantener fijo el tejido testicular, contra el fondo de la caja petri, y el otro para pasar repetidamente, aplicando una pequeña presión, por los túbulos seminíferos con la finalidad de liberar los espermatozoides contenidos en ellos. La presencia de espermatozoides se evalúa con el microscopio invertido. Si se observan los espermatozoides en el medio de cultivo, éste se aspira con una pipeta volumétrica y se coloca en un tubo de centrifuga estéril. Terminando el proceso de recuperación de espermatozoides, los tubos se incuban a 37°C. Antes de la microinyección, los tubos se centrifugan por 2 veces consecutivas a 600g x 5'. Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 200 a

300 ml de medio, y un 1 mL de esta suspensión se coloca en una gota de 4 ml de medio de cultivo tamponado con Hepes en la cápsula de microinyección. Los espermatozoides con motilidad progresiva nadan hacia la interfase medio de cultivo-aceite mineral desde donde son capturados con la micropipeta de microinyección. Estos espermatozoides son pasados a una gota de (Polivinilpirrolidona. PVP) donde son inmovilizados y luego microinyectados. Se recomienda realizar la biopsia el día anterior a la obtención de los ovocitos para permitir que los espermatozoides adquieran motilidad durante el cultivo y poder seleccionar los móviles.(8)

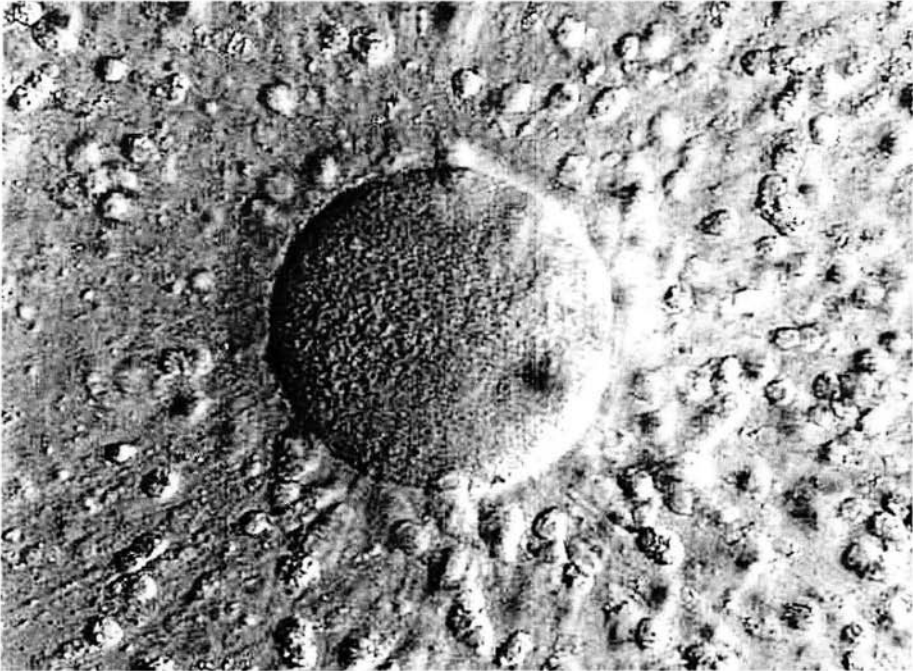
En caso que se observe un número muy reducido de espermatozoides, estos deben recuperarse directamente del material aspirado de la biopsia testicular. (8)

Si se observa que todos los espermatozoides obtenidos son inmóviles, se puede realizar una incubación en una solución hiposmótica de citrato de sodio, eligiéndose para microinyectar aquellos que muestren un grado de hinchamiento en el flagelo. (11)

PREPARACIÓN DE LOS OVOCITOS PARA EL ICSI.

Se prepara una solución de Hialuronidasa en medio tamponado conteniendo 80UI/ml. Se prepara una cápsula de doble compartimiento, en el compartimiento central 1 mL de la solución de hialuronidasa, y en el compartimiento marginal 2 ml de medio de cultivo. Con la pipeta Pasteur de 1 mm, colocar el ovocito, rodeado por su cúmulo, en la solución de

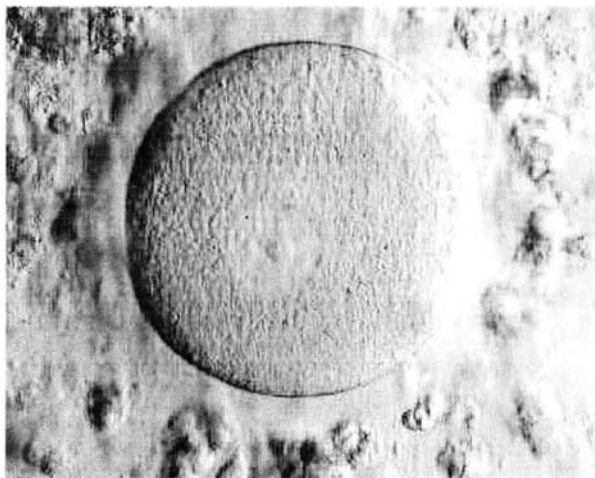
Pasteur de 300 Mm y llevarlo al compartimiento marginal, donde se vuelve a pipetear repetidamente hasta que se suelte el resto del cúmulo y luego, llevarlo a una nueva cápsula con medio de cultivo tamponado. Se desprende la corona pipeteando con la pipeta Pasteur de 120 Mmm. Se lava el ovocito denudado por 2 veces más en medio de cultivo nuevo.(19)



Oocito en Metafase II.

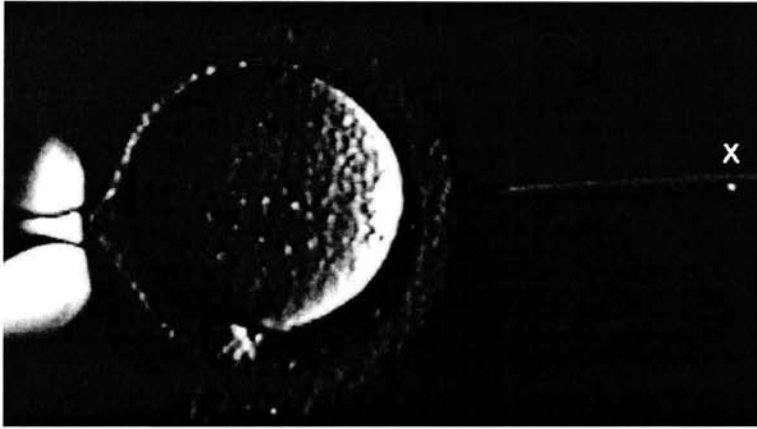
Este mismo procedimiento de denudación del ovocito se puede realizar en una cápsula preparada con 5 ó 6 microgotas bajo aceite mineral. La primera gota conteniendo 30 ml de la solución de hialuronidasa y las gotas restantes de 20 ml de medio tamponado, donde se realizan los sucesivos

lavados del ovocito. Se observa en cada uno de los ovocitos desnudos la presencia del primer corpúsculo polar (Meta fase II) y la morfología citoplasmática. Se seleccionan para el ICSI solo los ovocitos en Metafase II y con citoplasma normal y se guardan en la incubadora hasta el momento de la microinyección.(19)



Oocito maduro

Los ovocitos que no se encuentran en Metafase II se guardan en la incubadora y se pueden volver a examinar en el microscopio 3 ó 4 horas más tarde o hasta el momento del ICSI, para ver si han evolucionado a Metafase II.



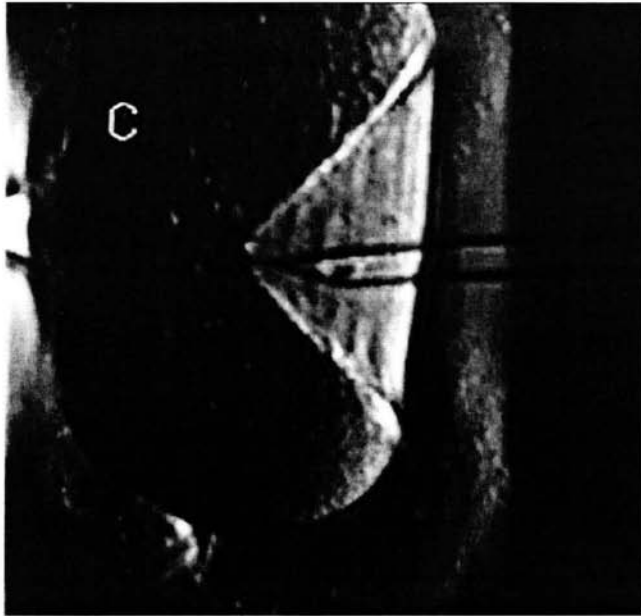
Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides

PROCEDIMIENTO DE INYECCION INTRACITOPLOSMATICA DE ESPERMAS.

Preparar con al menos 2 días de anticipación PVP al 1% con medio de cultivo tamponado y luego filtrarlo con membrana con poros de 0.8 mm de diámetro. Preparar una cápsula Falcon 1006 (cápsula de microinyección) conteniendo, ya sea : a) 2 gotas centrales de 4 microlitros de PVP al 1% y rodeadas de 4 ó más gotas de 5 microlitros de medio tamponado con Hepes y luego cubierta con aceite mineral, o b) con un set de 4 gotas de 4 microlitros de PVP al 1% y paralelamente otro set de 4 ó 5 gotas de 5 microlitros de medio tamponado con Hepes y luego cubierta con aceite mineral.(11)

IZT.

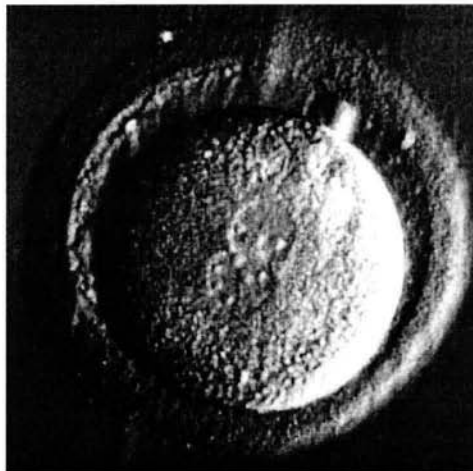




Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (Detalle)

En una gota de PVP, colocar, con ayuda de una pipeta automática 1 microlitro de suspensión de espermatozoides. Las otras gotas de PVP sirven para purgar el aceite mineral de la pipeta de microinyección y/o para inmovilizar los espermatozoides. Colocar en cada gota de 5 microlitros de medio tamponado 1 ovocito desnudo, y luego mantener esta cápsula en incubadora hasta el momento de la microinyección. Se montan las micropipetas en el micromanipulador. Colocar la cápsula anteriormente preparada en la platina del microscopio, se baja la pipeta de microinyección hasta una gota de PVP y purgar el aceite mineral aspirado por capilaridad y dejarla sumergida en la gota de PVP. Elevar levemente la pipeta de microinyección y llevarla a la gota de PVP con espermatozoides. Aspirar

suavemente un espermatozoide e inmovilizarlo por sucesivas pasadas por la punta de la micropipeta o por presión de la cola contra el fondo de la cápsula. Aspirar por la cola al espermatozoide inmovilizado y llevarlo en la punta de la micropipeta hasta una gota conteniendo un ovocito, e inmediatamente bajar la micropipeta inmovilizadora de ovocitos. Con esta micropipeta, inmovilizar el ovocito de modo que el corpúsculo polar quede posicionado, en relación a la esfera de un reloj, a las 12 ó 6 horas. Con esta misma relación, acercar a la hora 3 la pipeta de microinyección, con el espermatozoide muy cerca de la punta, presionar suavemente la zona pelúcida hasta romperla y formar un embudo al presionar la membrana plasmática del ovocito.(11)

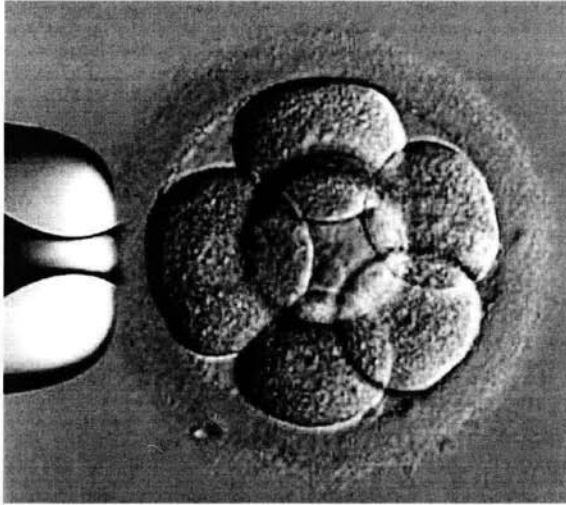


Embrión en etapa de pronúcleos



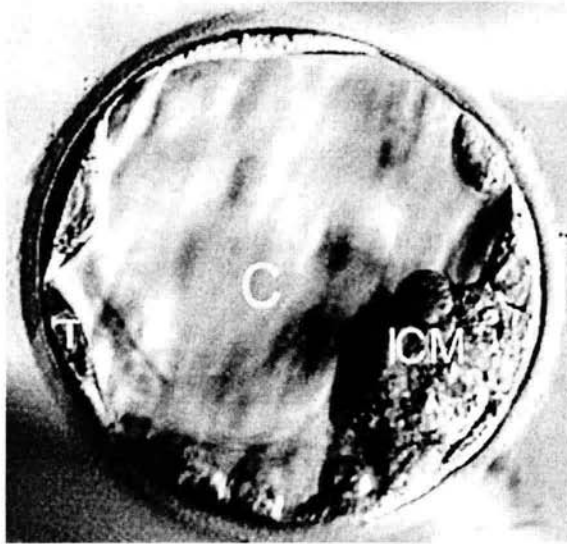
Embrión en etapa de dos células

Aplicar suavemente, con el microinyector, una leve presión negativa hasta que se observe un pequeño salto hacia atrás del espermatozoide (lo que revela la ruptura de la membrana plasmática) y la entrada a la punta de la micropipeta de una pequeña cantidad de citoplasma del ovocito. Retirar con suavidad la micropipeta del ovocito y soltarlo por leve presión positiva en la pipeta inmovilizadora del ovocito. Los ovocitos microinyectados se lavan en medio de cultivo y luego son transferidos a medio de cultivo de crecimiento e incubados a 37° y CO₂ al 5%.(12)



Mórula humana

A las 14 ó 18 horas de incubación examinar, en el microscopio invertido, los ovocitos microinyectados para verificar la fecundación por la presencia de 2 (Pronúcleos. PN) y 2 corpúsculos polares. La transferencia embrionaria se realiza a las 48 ó 72 horas de cultivo, luego de realizar la clasificación morfológica de los embriones.(28)



Blastocisto humano

ICM. Embrioblasto (Internal Celular Mass).

C. Cavidad del blastocisto (Blastocyst cavity).

T. Trofoblasto.

CONCLUSION

Se puede concluir que las prácticas de las técnicas de reproducción asistida deberá llevarse a cabo con una estricta vigilancia, con un seguimiento riguroso y con un escrupuloso respeto de sus indicaciones y alcances, en vista del peligro potencial de complicaciones que se presentan antes y durante la evolución del embarazo. Es necesario analizar la eficacia, costo, efectividad, factores de riesgo, aspectos socioreligiosos y legales antes de decidir someter a una pareja a técnicas de fertilización asistida.

BIBLIOGRAFIA

1. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 5th ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1994.
2. Sociedad para la tecnología de Reproducción Asistida y Sociedad Estadounidense para la Medicina Reproductiva. Tecnología de Reproducción Asistida en los E.U y Canadá. Resultados de 1993 generados a partir del registro de la sociedad estadounidense para la Medicina Reproductiva-Sociedad para la tecnología de Reproducción Asistida. Fertil Steril. 1995;64(1):13-21.
3. La sociedad Estadounidense de Fertilidad. Estándares mínimos revisados para fecundación in vitro, transferencia intrafalopía de gameto, y procedimientos relacionados. Fertil Steril. 1990;53(2):225-226
4. Cowan DB, Santis M, Keefe T, et al : A bridge to intracytoplasmic injection—high inseminating concentrations benefit patients who

- have a reduced change of fertilization with standard IVF. *Human Reprod* 11: 1985, 1996.
5. Hall J, Fishel S, Green S, et al: Intracytoplasmic sperm injection vs high insemination concentration in vitro fertilization in cases of very severe teratozoospermia. *Hum Reprod* 10: 493, 1995.
 6. Ord T, Patrizio P, Balmaceda JP, et al: Can severe male factor infertility be treated without micromanipulation? *Fertil Steril* 60:100,1993.
 7. Engel W, Murphey D, Schmind M: Are there genetic risks associated with microassisted reproduction? *Hum Reprod* 11:2359,1996.
 8. Levran D, Bider D, Yonesh M, et al: A randomized study of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus subzonal insemination (SUZI) for the management of severe male factor infertility. *J Assist Reprod Genet* 12: 319, 1995.
 9. Naz RK, Minhas BS: Enhancement of sperm function for treatment of male infertility. *J Androl* 16: 384, 1995.
 10. Mortimer D: The essential partnership between diagnostic andrology and modern assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 9: 1209, 1994.
 11. Palermo GD, Cohen J, Rozenwaks ZI: Intracytoplasmic sperm injection: A powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil Steril* 65:899,1996.
 12. Catt J, Ryan J, Pikel I, et al: Fertilization rates using intracytoplasmic sperm injection are greater than subzonal insemination but are dependent on prior treatment of the sperm. *Fertil Steril* 64: 764, 1995.

13. Tarin JJ: Subzonal insemination, partial zona dissection, or intracytoplasmic sperm injection? An easy decision? *Hum Reprod* 10: 165, 1995.
14. Van Steirteghem C, Liu J, Joris H, et al: Higher success rates by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination: Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 8: 1055, 1993.
15. Schenker JG, Ezra Y: Complications of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 61: 411-422, 1994.
16. Wall MB, Marks K, Smith TA: Cytogenetic and fluorescent in situ hybridization chromosomal studies on in vitro fertilized and intracytoplasmic sperm injected 'failed fertilized' human oocytes. *Hum Reprod* 11: 2230, 1996.
17. Alikani M, Palermo G, Adler A, et al: Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote* 3: 283, 1995.
18. Abdelmassih R, Sollia S, Moretto M, et al: Female age is an important parameter to predict treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 65:573, 1996.
19. Fishel S, Lisi F, Rinaldi L: Systematic examination of immobilizing spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 10: 497, 1995.
20. Stepto PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:366
21. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF. Predictive value of anormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;49:112

22. van Uem JFHM, Acosta AA, Swanson RG. Male factor evaluation in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1985;44:375
23. Sanger WG, Armitage JO, Schmidt MA. Feasibility of semen cryopreservation in patients with malignant disease. *JAMA* 1980;244:789
24. Davis OK, Bedford JM, Berkeley AS, Graf MJ, Rosenwaks Z. Pregnancy achieved through in vitro fertilization with cryopreserved sperm from a man with Hodgkin's lymphoma. *Fertil Steril* 1990;53:377-378
25. Rowland GF, Cohen J, Steptoe PC, Hewitt J. Pregnancy following in vitro fertilization using cryopreserved semen from a man with testicular carcinoma. *Urology* 1985;26:33-36
26. Davis OK, Adler A, Alikani M, Berkeley A, Graf M, Grifo J, Noyes N, Cohen J, Rosenwaks Z. The role of zona micromanipulation in IVF using Cryopreserved sperm for man with malignant neoplasia: The Cornell experience. Presented at the 8th World congress on in vitro Fertilization Alternate assisted reproduction; September 1993; Kyoto Japan.
27. Dodson WC, Whitesides DB, Hughes CL. Superovulation with intrauterine insemination in the treatment of fertility: a possible alternative to gamete intrafallopian transfer and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1987; 48:441
28. Jones GS, Uptate in in vitro fertilization. *Endrocr Rev* 1984;5:62
29. Barrón V.J;González M.M.;Kably A. Evolución histórica de la fertilización in vitro. *Ciencia y desarrollo*. 1996;130:24-27