



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA AGN & ASOC.
HOSPITAL ANGELES DEL PEDREGAL

“INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA (ICSI) vs
FERTILIZACIÓN IN VITRO/ICSI”
¿CUÁL ES LA MEJOR ALTERNATIVA?

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN:
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

QUE PRESENTA EL:

DR. GABRIEL CORTÉS DURÁN

TUTOR DE TESIS:

DR. ALFONSO JAVIER GUTIÉRREZ NÁJAR

DRA. MARÍA DEL SOCORRO BENAVIDES SALAZAR



Hospital Angeles

MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2008



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

CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA AGN & ASOC.
HOSPITAL ANGELES DEL PEDREGAL

“INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA (ICSI) vs
FERTILIZACIÓN IN VITRO/ICSI”
¿CUAL ES LA MEJOR ALTERNATIVA?

TUTORES DE TESIS:

DR. ALFONSO JAVIER GUTIÉRREZ NÁJAR
Director De La Clínica De Reproducción y Genética AGN y Asociados
Hospital Ángeles Pedregal
Profesor Titular Del Curso De Biología De La Reproducción Humana

DRA. MARÍA DEL SOCORRO BENAVIDES SALAZAR
Hospital Ángeles Pedregal
Profesor Adjunto Del Curso De Biología De La Reproducción Humana

MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2008

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	12
HIPÓTESIS.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	12
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	12
MATERIAL Y MÉTODO.....	13
RESULTADOS.....	18
CONCLUSIONES.....	24
ANEXOS.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	33

INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA (ICSI) vs FERTILIZACIÓN IN VITRO (FIV)/ ICSI. ¿CUAL ES LA MEJOR ALTERNATIVA?

RESUMEN

La Fertilización In Vitro y transferencia embrionaria (FIV/TE) es un método de Reproducción Asistida creado para aumentar la posibilidad de embarazo en las parejas que se enfrentan a problemas de infertilidad. Su finalidad es que los espermatozoides fecunden óvulos fuera del cuerpo de la mujer, cuando están imposibilitados para llevar a cabo la fertilización en su sitio natural, la trompa de Falopio. Ya realizada la fertilización los embriones son transferidos al útero. La fertilización In Vitro es un proceso complejo debido a todos los pasos que se requieren para lograrlo, el ciclo de Fertilización In Vitro requiere el monitoreo clínico de la paciente, los estudios realizados en el laboratorio deben de ser precisos y cuidadosos. Existe otra técnica que consiste en la microinyección directa del espermatozoide en el ovulo (ICSI: Intracytoplasmic Sperm Inyection), esta ultima, es una opción en parejas que antes no tenían otra opción y actualmente su uso se ha extendido, a tal grado que sus indicaciones absolutas han sido sobrepasadas y su utilización se ha vuelto injustificada en algunos casos.

La práctica del ICSI recomienda en los siguientes casos: Factor masculino severo: TEM (Total de espermatozoides móviles) post capacitación, menor a 5 millones o con espermatozoides de origen testicular o epididimario, obtenidos por biopsia testicular o aspiración respectivamente, Fallo previo de fecundación en FIV; otras indicaciones, como infertilidad idiopática, infertilidad con componente inmunológico, baja respuesta y edad avanzada de la mujer no se consideran indicaciones absolutas de ICSI y el empleo de esta técnica en estos casos se deja al criterio de cada centro, en función de su experiencia. En este trabajo, se pretende, partiendo de conceptos fisiológicos de fecundación, llamar la atención sobre los eventos involucrados en el ICSI y compararlo contra FIV convencional, evaluando los resultados al final de cada ciclo.

OBJETIVO: Evaluar los resultados de las técnicas de ICSI comparándolo con ciclos de FIV/ICSI, las diferencias en la cantidad de embriones obtenidos, en ambos grupos y embarazos.

DISEÑO: Estudio retrospectivo, observacional, descriptivo y transversal.

MATERIAL Y MÉTODO: Se incluyeron todas las pacientes con Infertilidad, sometidas a Hiperestimulación ovárica controlada y captura ovular, en el periodo comprendido de enero del 2005 a diciembre de 2007.

RESULTADO: Durante el periodo de Enero del 2005 a Diciembre del 2007 se realizaron 643 ciclos. Las pacientes se dividieron en 2 grupos, en el Grupo 1: se realizó 100% de ICSI a los ovocitos capturados: 486 Ciclos y en el Grupo 2 se incluyeron los ovocitos a los cuales se les realizó ICSI y FIV: 104 ciclos. Con el objetivo de homogeneizar la muestra, se aleatorizaron los casos de las pacientes del Grupo 1 para obtener solo 104 casos, para compararlos con el Grupo 2.

CONCLUSIONES: Los ovocitos a los cuales se les realizó ICSI, tuvieron una mayor proporción de embriones, en ambos grupos, aunque al final, a pesar de haber sido mayor la población de ovocitos en el grupo 2, hubo menor cantidad de embarazos.

INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA (ICSI) vs FERTILIZACIÓN IN VITRO (FIV)/ICSI. ¿CUÁL ES LA MEJOR ALTERNATIVA?

INTRODUCCIÓN

La Inyección Intracitoplasmática del Espermatozoide (ICSI) ha permitido resolver problemas de infertilidad masculina severa con excelentes resultados. Sin embargo, la difusión de la técnica llevó a su aplicación en casos donde no existía una indicación clara, desplazando muchas veces a la fertilización in vitro (FIV) sin suficientes argumentos. Las diversas observaciones descritas por los grupos de investigación básica dedicados a estos análisis, si bien no establecen un efecto indeseable inherente a la técnica, dejan abierta la investigación y permiten concluir que el ICSI es una técnica con claras indicaciones que no debe utilizarse indiscriminadamente; la difusión y el dominio del ICSI, con la idea de disminuir al máximo las fallas de fecundación por medio del FIV, muchos centros de fertilidad han optado por considerar a la ICSI como la técnica de elección, incluso cuando no existen indicaciones claras para su uso.

Varios grupos de investigación continúan estudiando los efectos y las alteraciones del ICSI, en relación con los mecanismos fisiológicos de fecundación humana y sus posibles implicaciones.^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Esta revisión presenta las bases fisiológicas del proceso de fecundación humana, para tomarlas como punto de referencia en el momento de describir los cambios que se suceden en el ICSI. No obstante, aún existen grandes enigmas en relación con la forma como evolucionan los embriones concebidos por esta técnica.

ANTECEDENTES

La fecundación humana constituye un proceso perfectamente coordinado de múltiples pasos, que involucra tanto la interacción del espermatozoide con los recubrimientos ovocitarios, como la penetración espermática a través de dichas estructuras y la fusión de las membranas plasmáticas ovocitaria y espermática, para culminar con la activación del ovocito.

Interacción espermatozoide cumulus y zona pelúcida

Los espermatozoides antes de encontrarse en condiciones para fecundar, deben residir durante un periodo mínimo en el tracto genital femenino, en un proceso denominado capacitación. Este permite la hiperactivación y remoción de glicoproteínas de la superficie espermática, exponiendo los receptores adecuados para recibir señales procedentes del ovocito.

Dentro de las células del cúmulus ovocitario se inicia el proceso de reacción acrosómica espermática, que implica la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, permitiendo la liberación de enzimas hidrolíticas por parte del acrosoma espermático. Dentro del cúmulus los espermatozoides en su mayoría ya experimentaron la reacción acrosómica y completan este proceso cuando ingresan en la zona pelúcida.⁷

Tanto la capacitación como la reacción acrosómica son eventos que pueden ser reproducidos *in vitro*, en ausencia de señales femeninas. La reacción acrosómica es un requisito crítico para la interacción de membranas de los gametos y no sólo permite el acceso del espermatozoide al espacio perivitelino sino que también expone y modifica regiones de la superficie espermática que facilitan su interacción.

La zona pelúcida ovocitaria contiene glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 y ZP3, que funcionan como receptores e intervienen en la interacción enzima-sustrato con el espermatozoide.

La unión inicial de membranas lleva a una firme adhesión célula-célula y termina con la fusión para formar una sola membrana.⁸

Activación ovocitaria

Una vez que se fusionan las membranas de los gametos, se desencadena una señal de transducción llamada activación ovocitaria que conlleva eventos morfológicos y bioquímicos, algunos de los cuales suceden en segundos o minutos y otros en el curso de horas. Uno de los cambios más tempranos es el incremento en los niveles de calcio intracelular, los cuales oscilan en forma repetida durante un periodo de varias horas después de la fusión de las membranas. La elevación del calcio intracelular ocasiona exocitosis de gránulos corticales, estructuras ubicadas por debajo de la membrana plasmática ovocitaria que al liberar su contenido enzimático al espacio perivitelino, modifican la zona pelúcida impidiendo el ingreso de otro espermatozoide. Este es uno de los principales mecanismos implicados en el control de la polispermia en humanos⁹

Otro componente crítico de la activación ovocitaria es el reinicio de la segunda meiosis que implica el ingreso al ciclo celular. La detención del ciclo celular está marcada por la actividad coordinada de kinasas. Antes de ser fecundados, los ovocitos maduros detienen su ciclo en la segunda meiosis, gracias al dominio de moléculas como: MPF (factor promotor de la maduración) y MAP (proteína mitógeno activada).

Poco después de la fusión de gametos y el aumento del calcio intracelular, se produce la inactivación del MPF y la disminución del MAP, lo cual representa la señal necesaria para continuar el ciclo celular, fenómeno evidente desde el punto de vista morfológico por la extrusión del segundo cuerpo polar. En el plano funcional se caracteriza por la capacidad para ensamblar el huso meiótico, la condensación de cromatina ovocitaria, la ruptura de la membrana nuclear y la formación de las membranas de los pronúcleos.¹⁰

Incorporación del espermatozoide al ooplasma

El contacto inicial de la cabeza espermática con la membrana plasmática ovocitaria ocurre a través de la membrana acrosomal interna expuesta después de la reacción acrosómica, seguida por el segmento ecuatorial y la parte posterior de la cabeza.

Los movimientos del flagelo espermático disminuyen y se detienen pocos segundos después de la fusión de las membranas. Hallazgos en microscopía electrónica muestran que la membrana acrosomal interna se degrada en la membrana ovocitaria siguiendo un proceso similar a la fagocitosis.

La teca perinuclear, estructura única del citoesqueleto espermático, ubicada entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear, es fundamental para la espermiogénesis y la estabilización de estructuras espermáticas, tal como se ha demostrado mediante estudios de inmunofluorescencia de ovocitos humanos inseminados y su análisis ultraestructural.

Tales observaciones ponen de manifiesto que la remoción del núcleo espermático después de la pérdida de la membrana plasmática y la interacción con la superficie ovocitaria, es un fenómeno que involucra microvellosidades ovocitarias ricas en microfilamentos de actina. La

desaparición de la teca perinuclear constituye un evento temprano en la fecundación en humanos, indispensable para la conversión del núcleo espermático en el pronúcleo masculino.¹¹ Una vez que el espermatozoide ingresa con su flagelo y es desprovisto del acrosoma comienza a sufrir cambios en el ooplasma. En la cabeza, después de la ruptura de la membrana nuclear, la cromatina condensada desde la espermatogénesis, es descondensada por intercambio de proteínas de empaque (protaminas por histonas), proceso inducido por el citoplasma ovocitario que proporciona las histonas necesarias para el intercambio, junto con enzimas que promueven la ruptura de uniones bisulfuro.

A nivel de la pieza intermedia espermática se encuentra una estructura fundamental que es incorporada al ooplasma: el centriolo distal. Este se duplicará haciendo uso del material pericentriolar ovocitario, dando origen al centrosoma del cigoto, una estructura que dirigirá posteriormente el desarrollo de pronúcleos y la formación del primer huso mitótico.¹² Cuando el flagelo espermático ingresa al ovocito disocia sus mitocondrias, las cuales vienen marcadas con proteínas llamadas ubiquitinas desde la espermatogénesis. A través de ellas son reconocidas y degradadas en el ooplasma, a través de un proceso mediado por proteosomas. De la misma forma también es degradada la vaina fibrosa. Así, la mayoría de estructuras remanentes del flagelo desaparecen rápidamente después de su incorporación.¹³ Varias horas después de la fusión de gametos, las oscilaciones de calcio cesan, se forman los pronúcleos femenino y masculino, y comienza la síntesis de ADN. Así culmina el proceso de la fecundación y se inicia la transición del genoma materno hacia la activación del genoma embrionario.

FECUNDACION EN ICSI

El proceso de fecundación en ICSI implica una serie de cambios en los mecanismos fisiológicos descritos *in vivo* e *in vitro*, que incluyen desde implicaciones técnicas, hasta la abreviación de los pasos descritos en la interacción de gametos y su consecuencia en los eventos conducentes a la formación de pronúcleos (Fig 1).

Primero debe realizarse una capacitación espermática en el laboratorio y seleccionar el espermatozoide, esta selección es arbitraria y al azar, realizada por quien lleva a cabo la técnica y basada fundamentalmente en la observación del movimiento y morfología espermáticos y no en su competencia natural.

En segundo lugar, el proceso de selección y captura del espermatozoide que será inyectado supone la exposición a estímulos físicos y químicos no fisiológicos, como el trauma sobre el flagelo para su inmovilización, la luz del microscopio y medios de cultivo especiales que frenan su movimiento.¹²

El ovocito antes de ser inyectado se somete a una manipulación enzimática y mecánica para ser desprovisto de las células del cúmulus e identificar su estado de madurez y la ubicación del primer cuerpo polar.

La descripción de la técnica del ICSI exige tomar como punto de referencia para ubicar el huso meiótico ovocitario, el lugar donde se encuentra el primer cuerpo polar. Esta recomendación busca evitar la inyección del espermatozoide sobre el huso, previniendo daños sobre tal estructura. Sin embargo, en ocasiones la manipulación ovocitaria previa puede desplazar la ubicación original del cuerpo polar y alterar su relación con el huso, haciendo que esta precaución no sea suficiente para evitar esta eventualidad¹².

Se sugiere la posibilidad de incorporar con la inyección del espermatozoide íntegro, ADN exógeno adherido a la superficie, situación que es evitada *in vivo* e *in vitro* en el proceso de interacción de membranas.¹²

EVENTOS CELULARES EN OVOCITOS FECUNDADOS POR ICSI VERSUS FIV

En el ICSI una vez que se selecciona el espermatozoide en la pipeta de microinyección es colocado directamente en el interior del ovocito, atravesando en un solo paso la membrana celular del ovocito, se introduce el espermatozoide íntegro, con el acrosoma y su contenido intactos y la teca perinuclear al ooplasma.¹² Esta maniobra de inyección sustituye los pasos descritos de interacción entre gametos, como reacción acrosómica, unión del espermatozoide a la zona pelúcida, penetración e interacción de membranas ovocitaria y espermática.⁴ La activación ovocitaria que se observa en la ICSI, sugiere que ciertos componentes espermáticos pueden desencadenarla, aun en ausencia de interacciones de membrana. Sin embargo, existen diferencias en los eventos de activación cuando se comparan con los descritos en FIV. Una de ellas es el inicio de las oscilaciones de calcio, retrasado de 30 minutos a varias horas.¹ Este hallazgo es consistente con la observación de otros eventos como emisión del segundo cuerpo polar y formación pronuclear, altamente variables entre ovocitos que son inyectados en momentos similares.

El retraso puede ser explicado por el mayor tiempo requerido para romper la membrana plasmática del espermatozoide y remover el acrosoma para exponer el factor espermático activador del ovocito presente dentro de la teca perinuclear. En animales de experimentación, empleando ratones, especialmente diseñados para investigar los efectos fisiológicos del retraso en la activación ovocitaria en ICSI, sugieren que existe una disminución en la capacidad reproductiva y longevidad de la descendencia resultante.¹⁴ Terada y cols¹⁵, realizaron FIV e ICSI en ovocitos de hámster libres de zona pelúcida con espermatozoides humanos y Ramalho-Santos y cols¹³ realizaron estudios de FIV e ICSI en ovocitos de monos rhesus^{4,13}, estos estudios han permitido la observación constante de eventos de fecundación específicos del ICSI. Tales trabajos están basados en la observación de estructuras espermáticas (teca perinuclear, ADN y mitocondrias del flagelo) y ovocitarias (ADN y microtúbulos), marcadas por técnicas de fluorescencia en diferentes momentos de la fecundación.

Las observaciones anteriores permitieron encontrar diferencias de la fecundación por ICSI en relación con FIV, en cuanto a degradación de estructuras de membrana espermática, descondensación de ADN, inicio de síntesis de ADN y formación de pronúcleos. La descondensación del ADN espermático ocurre asincrónicamente después del ICSI, comenzando desde la porción basal de la cabeza hasta el segmento apical cubierto por la teca perinuclear.

La formación del aster espermático a partir del centrosoma, la organización microtubular y la aposición pronuclear después del ICSI se llevan a cabo a pesar de no haber logrado una descondensación completa del ADN.

Señales correspondientes a la teca perinuclear pueden encontrarse en el ápex de la cabeza, incluso después de la aposición pronuclear 12 horas después de la inyección, momento en que en FIV ha ocurrido una descondensación completa del ADN. De hecho, es posible detectar restos de la teca perinuclear 20 a 24 horas después del procedimiento de ICSI. De igual manera, el acrosoma fue encontrado casi intacto a lo largo de las observaciones.

La presencia de cromosomas sexuales en la región apical de la cabeza espermática, lugar donde el proceso de descondensación es retrasado, puede relacionarse con el incremento en la tasa de alteraciones cromosómicas sexuales sugerido en recién nacidos de ICSI.¹⁶ La síntesis de ADN en ICSI se inicia sólo cuando el espermatozoide completa su descondensación y

parece ocurrir de manera sincrónica en ambos pronúcleos. Esto representa un retraso cuando se compara con cigotos obtenidos por técnicas de FIV.

Por otro lado, los gránulos corticales que normalmente sufren exocitosis después de la activación ovocitaria, pueden ser retenidos dentro del citoplasma después del ICSI. Aunque son eventualmente degradados o perdidos, se desconoce si la retención de tales residuos puede ocasionar efectos posteriores en el desarrollo. Igualmente, es incierto el efecto que tiene el ingreso del contenido acrosómico en el citoplasma ovocitario.

INDICACIÓN DE FIV:

- 1. • Fracaso en los tratamientos de baja complejidad**, como la inseminación intrauterina. Dependiendo de la experiencia del grupo al cual nos estemos refiriendo, se admite que, después de un fracaso de 4 a 6 tratamientos mediante IIU, es viable indicar una FIV, siempre y cuando existan evidencias de que la ovulación se produjo con la cronología adecuada (respecto a la inseminación) en base a la evolución de los niveles circulantes de progesterona o el control ultrasonográfico.
- 2. • Factor masculino severo.** Existen evidencias según las cuales es necesaria la existencia de al menos 5 millones de espermatozoides móviles progresivos para que la producción de un embarazo tras IIU no sea absolutamente casual. En consecuencia, parece legítimo indicar una FIV cuando el valor es inferior a 5 millones tras capacitación.
- 3. • Factor tuboperitoneal determinante o coadyuvante de la infertilidad.** Independientemente de la razón por la que las trompas hayan perdido su función (enfermedad inflamatoria pélvica, endometriosis, etc.), el tratamiento electivo de la infertilidad puede ser una FIV siempre que la función tubárica haya quedado anulada, si se desestima el tratamiento quirúrgico como mejor opción. También será indicación de FIV el tratamiento de la infertilidad tubárica no resuelta mediante cirugía, una vez transcurrido un tiempo prudente. Este periodo puede estimarse entre 6 meses y un año, dependiendo de la edad de la paciente.

Inyección Intracitoplasmática De Espermatozoides (ICSI).

Desde la publicación de la primera gestación obtenida mediante este procedimiento²⁴, la ICSI se ha generalizado rápidamente en el ámbito de la reproducción asistida. Esta técnica proporciona altas tasas de fecundación y de gestación clínica en situaciones de semen altamente patológico, con afectación severa de la concentración, la motilidad o la morfología espermática^{25,26,27}.

Los buenos resultados obtenidos con la técnica han llevado a varios autores a proponer su aplicación sistemática para minimizar la incidencia del fallo de fecundación^{28,29,30}. En concreto, algunos de los trabajos destinados a analizar la utilidad de la ICSI sistemática en la infertilidad de origen desconocido han tenido carácter de estudio aleatorio prospectivo con alta calidad metodológica^{31,32}. En la posición contraria se han situado otros autores, partidarios de reservar la indicación de la ICSI a casos con semen de calidad severamente alterada y a la existencia de antecedentes de falla de fecundación severa^{32,33}.

En una revisión sobre las indicaciones de la ICSI publicada en 1988, Hamberger³⁴ postula la existencia de indicaciones relativas y absolutas para la ICSI. Dentro del primer grupo incluyen la baja calidad seminal, la existencia de títulos elevados de anticuerpos antiespermatozoide y el antecedente de un ciclo previo de FIV con fecundación fallida; como indicaciones absolutas establece el antecedente de dos fallos previos de fecundación espontánea, la astenospermia absoluta, el uso de espermatozoides testiculares o epididimarios y un tercer grupo de indicaciones que permanecen en discusión, como la baja respuesta a la estimulación ovárica, la edad avanzada de la paciente o la infertilidad de causa desconocida.

Indicación del ICSI en el factor masculino severo

El uso del ICSI en casos de astenozoospermia total o cuando deben emplearse gametos procedentes de MESA/TESA está bien establecido³⁵. Sin embargo, permanece en discusión si los casos de astenospermia severa con recuperación límite de espermatozoides móviles deben tratarse mediante fecundación in vitro convencional, con soluciones espermáticas de alta concentración o mediante ICSI. En estos casos, se han formulado opiniones favorables al tratamiento directo mediante ICSI (especialmente en caso de teratozoospermia

asociada)^{29,30,31,32,33,34,35,36} o partidarias de aplicar la FIV con inseminación de altas concentraciones espermáticas³⁷. Otros estudios recomiendan en sus conclusiones actitudes intermedias, realizando ciclos de tratamiento combinado mediante la fecundación convencional de una parte de los ovocitos disponibles y la microinyección del resto³⁸. Este procedimiento permitiría obtener datos diagnósticos sobre la capacidad fecundante de los gametos, comparando las tasas de fecundación obtenidas por los dos procedimientos. Los resultados de los ensayos prospectivos destinados a comparar los resultados del tratamiento mediante ICSI y FIV convencional en pacientes con astenospermia severa evidencian una frecuencia de fallo de fecundación (tasa de fecundación inferior al 20 %) superior al 50 %, e insisten en la necesidad de la selección estricta de los casos para FIV convencional en caso de recuperaciones de espermatozoides móviles muy bajas³⁹. Este mismo estudio sugiere el límite de 106 espermatozoides con movilidad progresiva para permitir el intento de fecundación espontánea en oligoastenospermias severas.

Estudios posteriores han reducido este límite terapéutico a 500.000 espermatozoides móviles progresivos totales, y han observado una frecuencia de inmovilidad espermática a las 24 horas de la inseminación significativamente superior en los casos con antecedente previo de fallo de fecundación⁴⁰. Este mismo estudio revela que la existencia de una motilidad tipo A de la clasificación de la OMS¹⁸ críticamente reducida (menor del 5 %) se correlaciona con una tasa de fallo de fecundación significativamente superior, que puede ser revertida mediante la aplicación de ICSI. La influencia de la morfología espermática sobre la tasa de fecundación en FIV convencional ha sido también analizada^{42,43,44,45,46,47,48}. Benoff ha postulado la necesidad de disponer de al menos 25.000 espermatozoides móviles con morfología cefálica y acrosómica normal por ovocito para sustentar la indicación de FIV convencional⁴⁹.

Indicación de la ICSI en fallo previo de fecundación

Los casos de esterilidad con antecedente de fallo de fecundación (tasa de fecundación inferior al 20 %) son tributarios de tratamiento electivo mediante ICSI.

Diversos estudios ponen de manifiesto que la probabilidad de fallo de fecundación iterativo cuando se somete a estas pacientes a un segundo ciclo de FIV convencional es elevada^{50,51}. Algunos autores han sugerido la posibilidad de seleccionar ciertos casos de fallo de fecundación

para un segundo intento de FIV convencional, aplicando criterios para identificar a aquellas parejas con menor riesgo de recurrencia^{52,53,54}. Basándose en este análisis, proponen que la indicación de ICSI sea absoluta ante un segundo ciclo de FIV fallida o tras el primer fallo de fecundación, siempre que se detecten factores desfavorables como baja calidad seminal y ovocitaria, o infertilidad de causa desconocida. Por el contrario, otros grupos pregonizan el uso sistemático de la ICSI, al que consideran un instrumento eficaz para reducir al mínimo la tasa final de ciclo sin transferencia y aumentar el porcentaje de transferencia de embriones de buena calidad^{55,56,57}.

OBJETIVOS PRINCIPALES:

- Evaluar los resultados de las técnicas de ICSI comparandolo con ciclos de FIV/ICSI.
- Determinar las diferencias en ambas poblaciones.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- Evaluar las diferencia en la cantidad de embriones obtenidos, en ovocitos sometidos a FIV e ICSI vs ICSI únicamente
- Determinar:
 - Promedio de embriones por ciclo, en ambos grupos
 - Tasa de embarazo.

HIPÓTESIS

La realización de ICSI a los ovocitos, independientemente del Factor de Infertilidad, nos permite incrementar el número de los embriones obtenidos en el ciclo y la tasa de embarazo.

JUSTIFICACIÓN

La realización de ICSI ha incrementado a nivel mundial, desde su introducción en la practica clínica, pero la decisión de realizar esta técnica, debería estar basada únicamente en parámetros clínicos objetivos, esta evaluación es importante, si se tiene en cuenta que el uso de esta técnica implica un costo económico mayor a la realización de FIV. La adecuada valoración de la calidad ovocitaria y los parámetros espermáticos, permiten seleccionar los casos en los cuales se realizará FIV, ICSI o ambos, por lo que analizaremos si al realizar ICSI al 100% de ovocitos obtenidos, se obtiene una mayor cantidad de embriones y embarazos.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Es de tipo observacional, descriptivo y transversal, analizado por medio del programa SPSS 12.0 (Statistical Packaged for social sciences 12.0) y Microsoft Excel.

MATERIAL Y MÉTODO

Sujetos de estudio.

Se incluyeron todas las pacientes con Infertilidad, sometidas a Hiperestimulación ovárica controlada y captura ovular, en el periodo comprendido de enero del 2005 a diciembre de 2007.

Criterios de inclusión.

- ≈ Todas las pacientes que se realizaron ciclos de ICSI o FIV/ICSI, desde enero del 2005 a diciembre del 2007

Criterios de Exclusión.

Los ciclos en los cuales los datos estaban incompletos

Ciclos cancelados por mala respuesta a la Hiperestimulación ovárica controlada

Falla total de FIV

Falla total de ICSI

Durante el periodo de Enero del 2005 a Diciembre del 2007 se realizaron 643 ciclos. Se excluyeron 53 casos, por haber sido cancelados o información incompleta.

Variables a estudiar:

- ≈ Edad
- ≈ Diagnostico de Infertilidad
- ≈ Ovocitos sometidos a FIV/ICSI o solo ICSI
- ≈ Embriones en 2 pronúcleos en 1er día
- ≈ Embriones en 4 células en día 2
- ≈ Embriones en 8 células en día 3
- ≈ Blastocistos
- ≈ Embriones transferidos
- ≈ Día de la transferencia
- ≈ Movilidad espermática pre capacitación
- ≈ Total de espermatozoides móviles pre capacitación
- ≈ Movilidad espermática post capacitación
- ≈ Total de espermatozoides móviles post capacitación

Las pacientes se dividieron en 2 grupos:

≈ Grupo 1: se realizó 100% de ICSI a los ovocitos capturados: 486 Ciclos.

Grupo 2: En este grupo se seleccionaron ovocitos a los cuales se les realizó ICSI y FIV: 104 ciclos.

Con el objetivo de homogeneizar la muestra, se aleatorizaron los casos de las pacientes del Grupo 1 por medio del programa SPSS 12.0, y obtener solo 104 casos, para compararlos con el Grupo 2.

Para el grupo 1: Todas las pacientes recibieron manejo para supresión hipofisiaria utilizando: Agonistas de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en 44 pacientes, Antagonistas de GnRH en 60 pacientes, utilizando para la estimulación ovárica, hormona folículo estimulante recombinante (FSHr) y menotropinas (HMG) con una dosis promedio de 2381.4 ± 149.8 unidades, un promedio de 10.3 ± 0.25 días de estimulación.

Para el grupo 2: Todas las pacientes recibieron manejo para supresión hipofisiaria utilizando: Agonistas de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en 40 pacientes, Antagonistas de GnRH en 64 pacientes, utilizando para la estimulación ovárica, hormona folículo estimulante recombinante (FSH r) y menotropinas (HMG) con una dosis promedio de 2381.4 ± 149.8 unidades, un promedio de 10.3 ± 0.25 días de estimulación, para el Grupo 2

La aspiración folicular se realizó 36 horas después de la aplicación de 10,000 UI de hormona gonadotropina coriónica (hCG) con la presencia de al menos 4 folículos de 18-20 mm de diámetro determinada por ultrasonido con nivel de 200-250 pg/ml de estradiol por folículo, con una media de estradiol de disparo en 3346.8 ± 590 pg/ml en el Grupo 1 y 3150 ± 510 pg/ml en el Grupo 2.

Los procedimientos de fertilización utilizados fueron FIV e ICSI, los cuales fueron realizados por un solo grupo de biólogos de acuerdo a las técnicas convencionales. Los ovocitos capturados fueron colocados en medio de cultivo "*Human Tubal Fluid*" (HTF), enriquecido con Suero Sintético Substituto (Irving Scientific, Santa Ana, CA, USA) e incubados a 37°C y 5.0% CO_2 .

Para realizar el FIV convencional, se utilizó un promedio de 100,000 espermatozoides móviles (progresión tipo A y B) por cada mililitro de medio de cultivo.

La muestra de semen se analizó con base en los parámetros descritos en el Manual de análisis de semen publicados por Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999), la separación de los espermatozoides móviles fue por medio de gradientes discontinuos, usando kit de “*Sperm Grad*” (Sydney IVF Cook). La preparación de los ovocitos para el ICSI se realizó de acuerdo a lo publicado por Palermo (Palermo G, et al., 1992) microinyectándose sólo los ovocitos en estadio de metafase II. Todos los ovocitos fertilizados se colocaron en medio de cultivo secuencial G1.3+G2.3 (Vitrolife Fertility Systems, South Inca Street Englewood, Colorado, USA) suplementado con suero sintético sustituto.

Entre 16-18 horas post-inseminación se evaluó la fertilización de los ovocitos. La tasa de fertilización se basó en el número de ovocitos con dos pronúcleos (2PN) dividido entre el número de ovocitos metafase II inseminados. Los ovocitos con fertilización anormal (1PN ó 3 PN) se excluyeron del presente estudio.

El sistema de calificación de los cigotos utilizado en el laboratorio de FIV de nuestra clínica, se basa en la suma de dos sistemas. El primero de ellos, es el criterio propuesto por Scott y colaboradores (2003), el cual asigna los valores de Z1, Z2 y Z3 de acuerdo a los siguientes puntos de referencia:

Z1:

- a) Pronúcleos simétricos con nucleólos alineados en la región donde se unen ambos pronúcleos,
- b) Número entre 3-7 entre ambos pronúcleos,

Z2:

- a) Pronúcleos simétricos con nucleólos NO alineados,
- b) Número entre 3-7 entre ambos pronúcleos,

Z3:

- a) Los pronúcleos pueden ser o no simétricos, existe una diferencia de más de 3 nucleólos entre ambos pronúcleos,
- b) El tamaño de los nucleólos puede ser igual o desigual entre ambos pronucleos.

El segundo criterio asigna valores numéricos (0 y 1) de acuerdo a la presencia de los siguientes parámetros:

c) Citoplasma:

- a. presencia de halo = 1
- b. ausencia del halo = 0
- c. presencia de granulación= 0
- d. ausencia de granulación= 1
- e. presencia de vacuolas= 0
- f. ausencia de vacuolas= 1

d) Cuerpos polares:

- a. menor que 2= 0
- b. igual a 2= 1
- c. fracturados= 0
- d. no fracturados= 1
- e. ángulo de separación $\leq 90^\circ$ entre ambos cuerpos= 1
- f. ángulo de separación $> 90^\circ$ entre ambos cuerpos= 0

e) Espacio Perivitelino:

- a. presencia de detritos celulares= 0
- b. ausencia de detritos celulares= 1
- c. tamaño normal= 1
- d. tamaño anormal= 0

f) Zona Pelúcida:

- a. grosor normal= 1
- b. grosor anormal= 0
- c. apariencia normal= 1
- d. apariencia anormal= 0

Para determinar la calificación final al cigoto, se realizó una suma del primer criterio (Z-score) con el puntaje obtenido de los parámetros restantes.

Transferencia embrionaria

Dado que los embriones fueron obtenidos por ICSI y FIV/ICSI en el otro Grupo, se seleccionaron los mejores embriones de ambas técnicas para Transferencia Embrionaria, la cual pudo ser mixta en algunos casos, es decir, embriones de FIV e ICSI transferidos al mismo tiempo.

RESULTADOS

Se incluyeron únicamente 104 pacientes en cada grupo, con diagnóstico de Infertilidad. El análisis por edad de los pacientes fue:

En el Grupo 1:

El promedio de edad, fue mayor para la edad del hombre: 39.3vs36.7 en la mujer (Tabla 1 Edad en las parejas).

Para el Grupo 2:

El promedio de edad, fue mayor para la edad del hombre: 38.4vs36.5 en la mujer (Tabla 2 Edad en las parejas).

Los diagnósticos por grupo son los siguientes:

Diagnósticos de las pacientes. Grupo 1:

- ≈ Factor Masculino:43
- ≈ Tubario: 39
- ≈ Factor Edad: 24 pacientes
- ≈ Endometriosis: 22
- ≈ Ovodonación: 20
- ≈ PCO (Síndrome de Ovarios Poliquísticos):8
- ≈ Miomatosis uterina: 7
- ≈ Inexplicable: 1
- ≈ Ooforectomía unilateral: 1

Un solo Factor de Infertilidad: 52 pacientes

Dos Factores de Infertilidad: 43 pacientes

Tres o más Factores de Infertilidad: 9 pacientes

Diagnósticos de las pacientes. Grupo 2:

- ≈ Tubario:33
- ≈ Ovodonación:32
- ≈ Masculino:20
- ≈ Edad:20
- ≈ Endometriosis:18
- ≈ PCO:10
- ≈ Miomatosis uterina:4

- ≈ AID:2
- ≈ PGR (Pérdida Gestacional Recurrente):1
- ≈ HTA (Histerectomía Total Abdominal):1
- ≈ FOP (Falla Ovárica Prematura):1
- ≈ Inexplicable:1
- ≈ Cervical:1

Un solo Factor de Infertilidad: 67 pacientes

Dos Factores de Infertilidad: 28 pacientes

Tres o más Factores de Infertilidad: 9 pacientes

Los folículos observados por ultrasonido en el Grupo 1 fueron 1304, y se capturaron 1110 ovocitos (85.12%), a su vez en el Grupo 2, se observaron 1853 folículos y se capturaron 1840 ovocitos (99.2%).

Los ovocitos capturados por grupo, se clasificaron de la siguiente forma:

GRUPO 1 (Tabla 7)

Ovocitos en Metafase II: 1012

Ovocitos en Metafase I: 38

Ovocitos Inmaduros: 33

Ovocitos Fracturados: 9

Ovocitos Atrésicos: 16

GRUPO 2 (Tabla 8)

Ovocitos en Metafase II: 1660

Ovocitos en Metafase I: 95

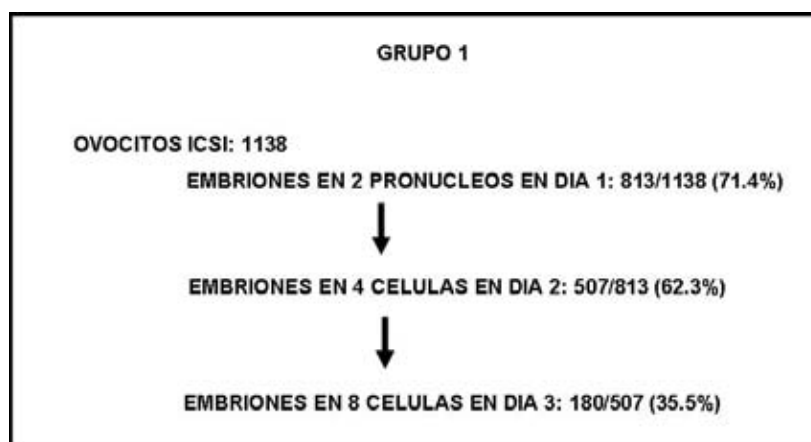
Ovocitos Inmaduros: 51

Ovocitos Fracturados: 15

Ovocitos Atrésicos: 14

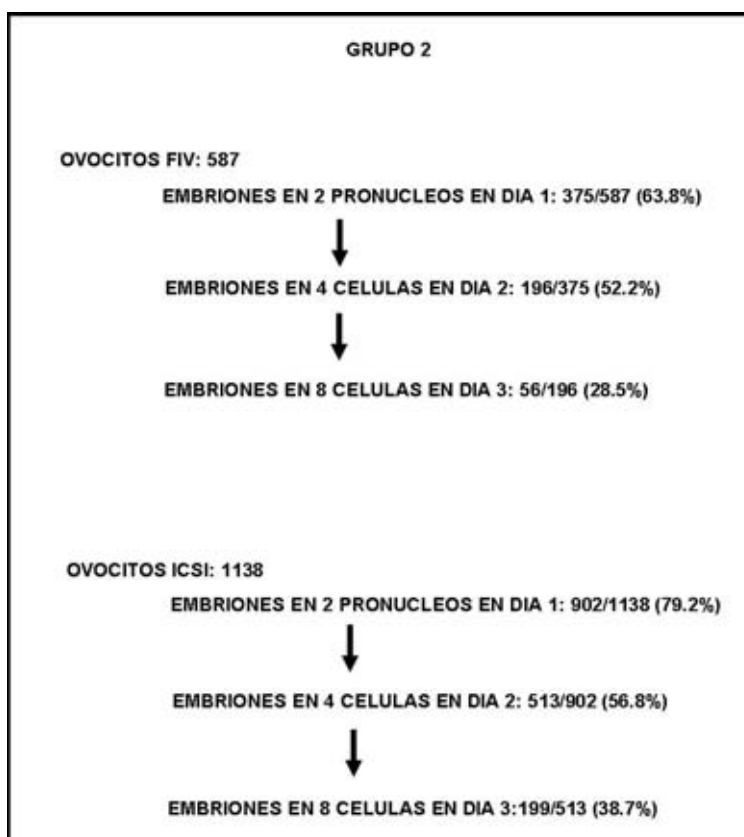
Ya que solo se utilizaron los ovocitos en metafase II, para realizar FIV o ICSI (Grafica 2) (Tabla 7 y 8).

Y en el siguiente esquema, se representa la evolución y desglose de los ovocitos del Grupo 1



En las siguientes tablas, se desglosa la población incluida dentro del Grupo 2, es decir, aquellos ovocitos a los cuales se les realizó FIV o ICSI, así como su evolución, una vez fertilizados, hasta su estadio de 8 células, como vimos, las proporciones son mejores dentro del Grupo de ICSI, cuyos porcentajes, son similares a los encontrados en el Grupo 1 (Tabla 10 y 11).

Y en el este esquema, se representa la evolución y desglose de los ovocitos del Grupo 2



COMPARACIÓN DE LOS BLASTOCISTOS Y EMBRIONES TRANSFERIDOS. GRUPO 1 vs GRUPO 2

	N	Suma	Media	Desv.Estandar
BLASTOCISTOS. Grupo 1	104	43	.41	1.425
EMBRIONES TRANSFERIDOS. Grupo 1	104	311	2.99	.887
BLASTOCISTOS. Grupo 2	104	36	.35	.973
EMBRIONES TRANSFERIDOS. Grupo 2	104	311	2.99	.960

Al evaluar la cantidad de blastocistos obtenidos en ambos grupos, utilizando la Prueba de X^2 , encontramos una $p > 0.33$, lo cual no tiene significancia estadística.

Al evaluar las muestras homologas de semen utilizadas en el ciclo, los resultados fueron:

GRUPO 1	
ORIGEN	N
Heterologa	3
Homologa	101
Total	104

GRUPO 2	
ORIGEN	N
Heterologa	7
Homologa	97
Total	104

En cuanto a los parámetros Pre Capacitación Espermática, son los siguientes:

GRUPO 1. PRE CAPACITACIÓN			
	N	Media	Desv.Estandar
MOVILIDAD	104	39.48	17.797
CUENTA	104	83.37	81.183
TEM	104	96.90	112.628

GRUPO 2. PRE CAPACITACIÓN			
	N	Media	Desv.Estandar
MOVILIDAD	104	43.67	16.993
CUENTA	104	94.489	78.9828
TEM	104	115.433	107.8684

En cuanto a los parámetros Post Capacitación Espermática son los siguientes:

GRUPO 1. POST CAPACITACIÓN			
	N	Media	Desv.Estandar
MOVILIDAD	104	70.40	24.352
CUENTA	104	25.70	25.950
TEM	104	19.648	24.3847

GRUPO 2. POST CAPACITACIÓN			
	N	Media	Desv.Estandar
MOVILIDAD	104	81.32	13.407
CUENTA	104	34.20	28.129
TEM	104	27.42	24.406

La evaluación de la progresión:

GRUPO 1. PROGRESIÓN PRECAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

GRADO	n
1+	11
1+2+	38
2+	13
2+3+	37
3+	5
Total	104

GRUPO 2. PROGRESIÓN PRECAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

GRADO	n
1+2+	33
2+	14
2+3+	55
3+	2
Total	104

GRUPO 1. PROGRESIÓN POST CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

GRADO	n
1+	1
1+2+	3
2+	4
2+3+	31
3+	8
3+4+	40
4+	13
4+2+	1
4+3+	3
Total	104

GRUPO 2. PROGRESIÓN POST CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

GRADO	n
2+	3
2+1+	1
2+3+	12
3+	6
3+4+	69
4+	13
Total	104

Todas las muestras de semen, cumplían los requisitos mínimos para realizar FIV, aunque en los casos con Diagnóstico de Factor Masculino, como causal de la Infertilidad, encontramos alteración de la Espermatobioscopía.

En ninguno de los ciclos incluidos, hubo falla total de la fertilización, lo cual fue un criterio de exclusión.

A continuación, se observa los embarazos obtenidos en ambos grupos, en los cuales la diferencia es mínima (Grafica 3 y 4): 24 Embarazos en el Grupo 2 vs 27 Embarazos en el Grupo 1, a pesar de la diferencia inicial de ovocitos (1012 ovocitos en Metafase II en Grupo 1 vs 1660 ovocitos en Metafase II en Grupo 2).

CONCLUSIONES

Dada la tendencia al incremento en ciclos de ICSI con respecto a FIV y a las publicaciones que sugieren la realización de esta técnica en todos los casos de concepción *in vitro*, independiente de su etiología, surgen inquietudes sobre los riesgos potenciales para los embriones y su progresión en la división, previo a su transferencia al medio intrauterino.

Sólo cuando se analizan de manera cuidadosa las tasas de fecundación, de implantación y de embarazo, entre otras, es posible realizar debates conducentes a respaldar una posición frente a tales interrogantes. La mayoría de publicaciones hacen referencia al ICSI como un procedimiento seguro, afirmación apoyada en las altas tasas de fecundación y embarazo y en la incidencia de malformaciones congénitas mayores y menores comparables a las obtenidas en FIV.^{17,18} Por otro lado, aunque es llamativo el hallazgo de un ligero incremento en la incidencia de alteraciones cromosómicas *de novo* en nacidos de ICSI, su causa no ha sido completamente aclarada y no existen argumentos suficientes para establecer una relación de causa efecto inherente a la técnica.

En estudios que observan la capacidad de progresión de los embriones al estado de blastocisto según su origen en FIV o ICSI, se informa una disminución significativa en este potencial en embriones para ICSI, al igual que un menor porcentaje de *hatching* embrionario en este grupo.^{19, 20}, esta tasa aumentada de implantación puede ser debida a Assisted Hatching. Sin embargo, también se observa una tendencia no significativa hacia mejores tasas de implantación en día 2 ó 3 para embriones de ICSI. Investigando la sugerencia del ICSI como posible tratamiento de elección para todos los casos de concepción *in vitro*, se reafirma su indicación en factores masculinos severos y se plantea que en ausencia de esta etiología, las tasas de fertilización son comparables con las de FIV.^{21, 22} Considerando el análisis de costo-beneficio en el uso del ICSI como técnica de elección rutinaria, se encuentra un incremento en cuanto a costo-efectividad.²³

La baja respuesta a la estimulación ovárica y, en consecuencia, la escasez de ovocitos aptos para la fecundación ha sido propuesta como indicación para la ICSI, con el ánimo de mejorar la tasa de fecundación y el número de embriones disponibles.^{58,59} No obstante, estudios diseñados con el fin de analizar la eficacia de esta actitud, han demostrado que la utilización de ICSI no mejora las tasas de gestación cuando se indica de forma sistemática en casos de escasez de ovocitos fecundables, a pesar de que sí se incrementa la tasa de transferencia por ciclo

iniciado^{60,61}. Estos resultados expresan probablemente la existencia de defectos intrínsecos del ovocito, que afectan tanto a su fecundabilidad como a la capacidad de desarrollo posterior del cigoto resultante.

Otra indicación relativa que se viene señalando desde hace unos años es el diagnóstico de infertilidad sin causa aparente, que se ha asociado a un mayor riesgo de fallo de fecundación en FIV convencional reversible mediante ICSI^{28,31,62,63}.

La edad avanzada de la mujer se ha relacionado con las tasas de fecundación en FIV según una razón inversa, y la ICSI ha sido propuesta para incrementarlas⁶⁴. Sin embargo, diferentes autores sostienen que la edad avanzada de la mujer tiene un impacto negativo en las tasas de fecundación obtenidas por FIV e ICSI, y que no se logran beneficios adicionales en términos incremento de tasa de gestación cuando se usa la microinyección espermática para contrarrestar el efecto negativo de la edad femenina avanzada^{65,66,67}. Finalmente, se ha sugerido que la ICSI podría mejorar los resultados de la FIV convencional en presencia de factor inmunológico severo, en presencia de altas concentraciones de anticuerpos antiespermatozoide con efecto inmovilizante^{68,69}.

Como pudimos observar en nuestro estudio, a pesar de las diferencias en las proporciones de embriones obtenidos, al final, los embarazos obtenidos son similares en ambos grupos; con un número de blastocistos en el cual no hubo significancia estadística. Como vimos en el grupo 1 y el subgrupo de ICSI del Grupo 2, hay una mayor cantidad de embriones, sin que eso se refleje en una mayor cantidad de embarazos, al comparar la tasa final de embarazos en ambos grupos.

ANEXOS



Fig. 1. Se observa el momento en que es microinyectado el espermatozoide.

	n	Media	Desviación Estándar
EDAD DE LA MUJER	104	36.7	4.74
EDAD DEL HOMBRE	104	39.3	6.07

TABLA 1. EDAD DE LA PAREJA EN EL GRUPO 1

	n	Media	Desviación Estándar
EDAD DE LA MUJER	104	36.5	4.82
EDAD DEL HOMBRE	104	38.4	5.85

TABLA 2. EDAD EN LAS PAREJAS EN EL GRUPO 2

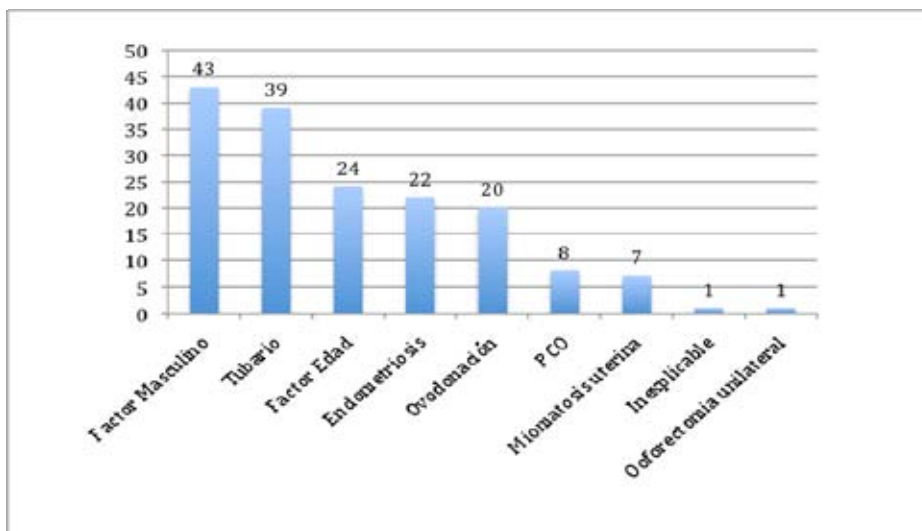


TABLA 3. FACTORES DE INFERTILIDAD EN EL GRUPO 1

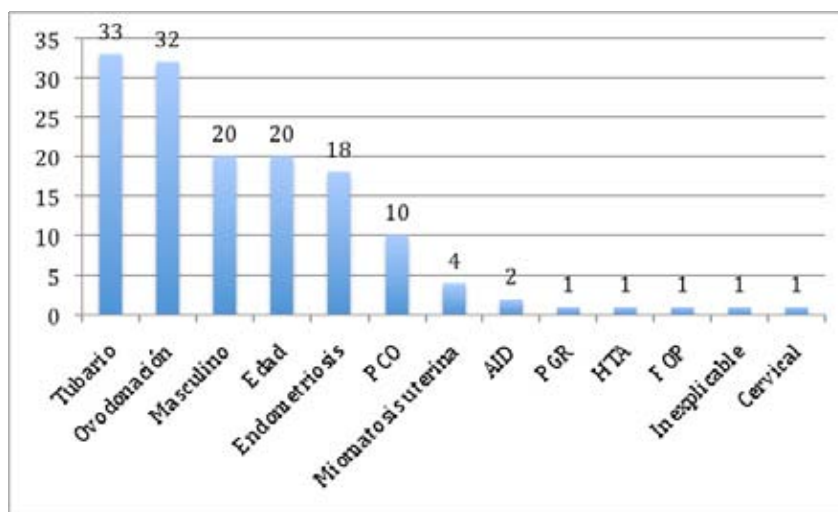
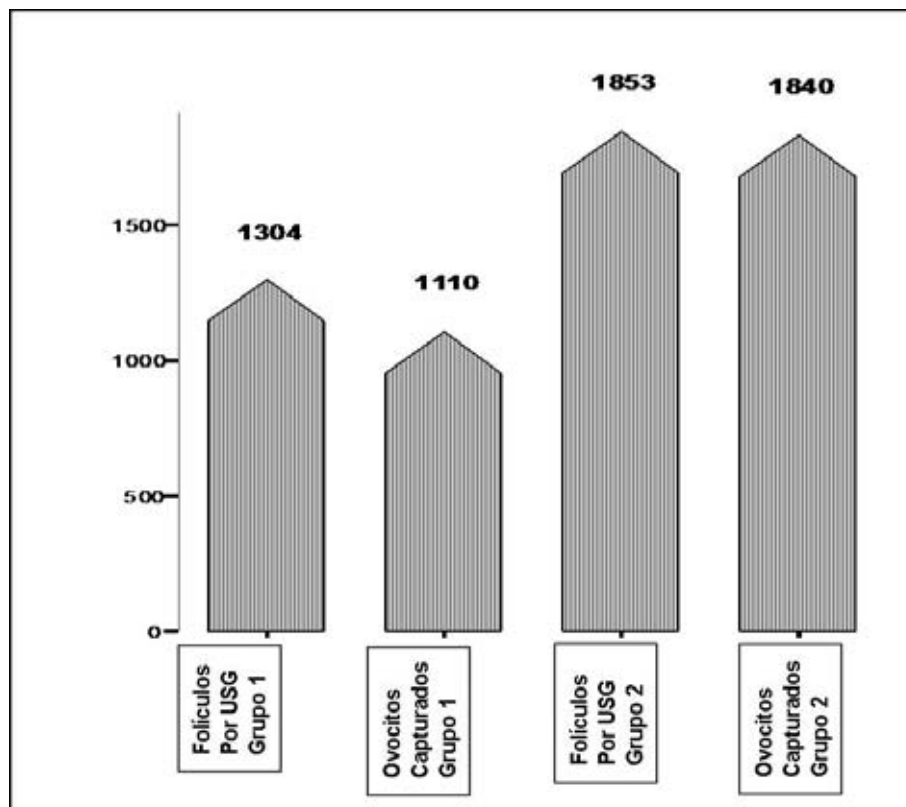


TABLA 4. FACTORES DE INFERTILIDAD EN EL GRUPO 2

GRUPO 1			
	Suma	Media	DE
FOLICULOS POR ULTRASONIDO	1304	12.54	6.848
OVOCITOS CAPTURADOS	1110	10.67	5.988

TABLA 5. FOLÍCULOS OBSERVADOS POR ULTRASONIDO vs OVOCITOS CAPTURADOS



GRÁFICA 1. SE OBSERVA LA PROPORCIÓN ENTRE FOLÍCULOS OBSERVADOS EN ULTRASONIDO vs OVOCITOS CAPTURADOS, EN AMBOS GRUPOS.

GRUPO 2			
	Suma	Media	DE
FOLICULOS POR ULTRASONIDO	1853	17.82	7.384
OVOCITOS CAPTURADOS	1840	17.69	6.992

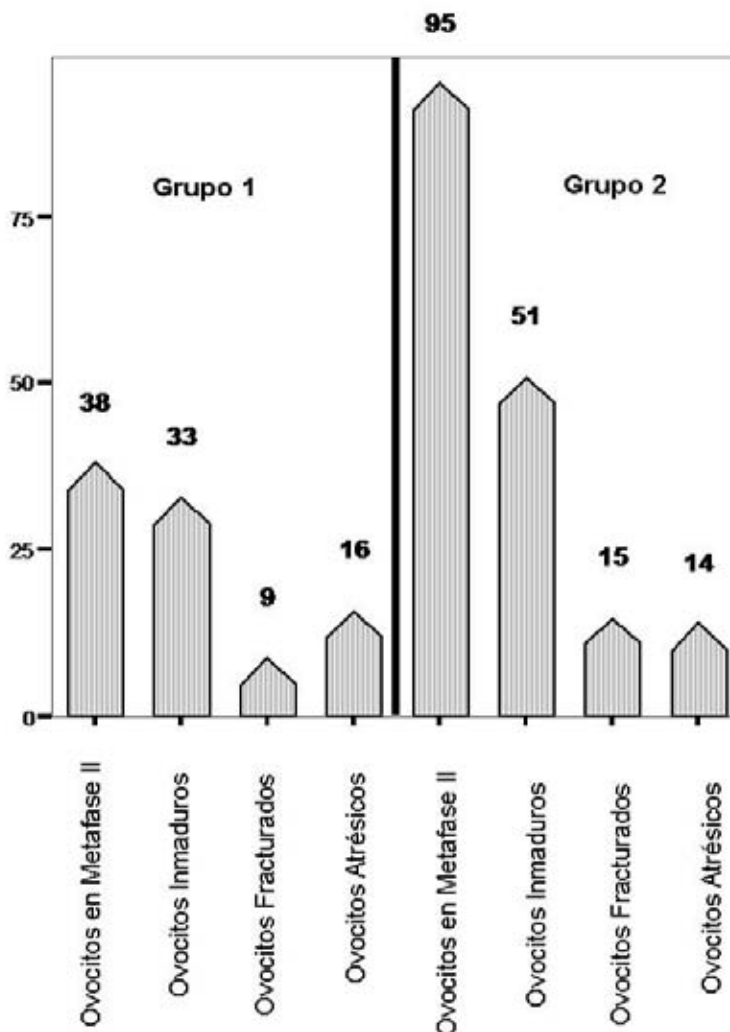
TABLA 6. FOLÍCULOS OBSERVADOS POR ULTRASONIDO vs OVOCITOS CAPTURADOS

GRUPO 1			
	Pacientes	Suma	Media
OVOCITOS EN METAFASE II	104	1012	9.73
OVOCITOS EN METAFASE I	104	38	.37
OVOCITOS INMADUROS	104	33	.32
OVOCITOS FRACTURADOS	104	9	.09
OVOCITOS ATRESICOS	104	16	.15

TABLA NO 7. CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS CAPTURADOS DEL GRUPO 1

GRUPO 2			
	Pacientes	Suma	Media
OVOCITOS EN METAFASE II	104	1660	15.96
OVOCITOS EN METAFASE I	104	95	.91
OVOCITOS INMADUROS	104	51	.49
OVOCITOS FRACTURADOS	104	15	.14
OVOCITOS ATRESICOS	104	14	.13

TABLA NO 8. CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS CAPTURADOS DEL GRUPO 1



GRÁFICA 2. SE OBSERVAN LAS DISTINTAS PROPORCIONES EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS EN AMBOS GRUPOS

GRUPO 1			
	Pacientes	Suma	Media
OVOCITOS EN ICSI	104	1010	9.71
EMBRIONES EN DOS PRONUCLEOS	104	813	7.82
POLISPERMIA	104	31	.30
PRONUCLEOS ARRESTADOS	104	12	.12
EMBRIONES CLIVADOS	104	752	7.23
EMBRIONES CLIVADOS ARRESTADOS	104	303	2.91
EMBRIONES EN 4 CELULAS EN DIA 2	104	507	4.88
EMBRIONES EN 8 CELULAS EN DIA 3	104	180	1.73

TABLA 9. ÚNICAMENTE LOS OVOCITOS EN METAFASE II FUERON INSEMINADOS, YA SEA MEDIANTE FIV O ICSI.

GRUPO 2. FIV

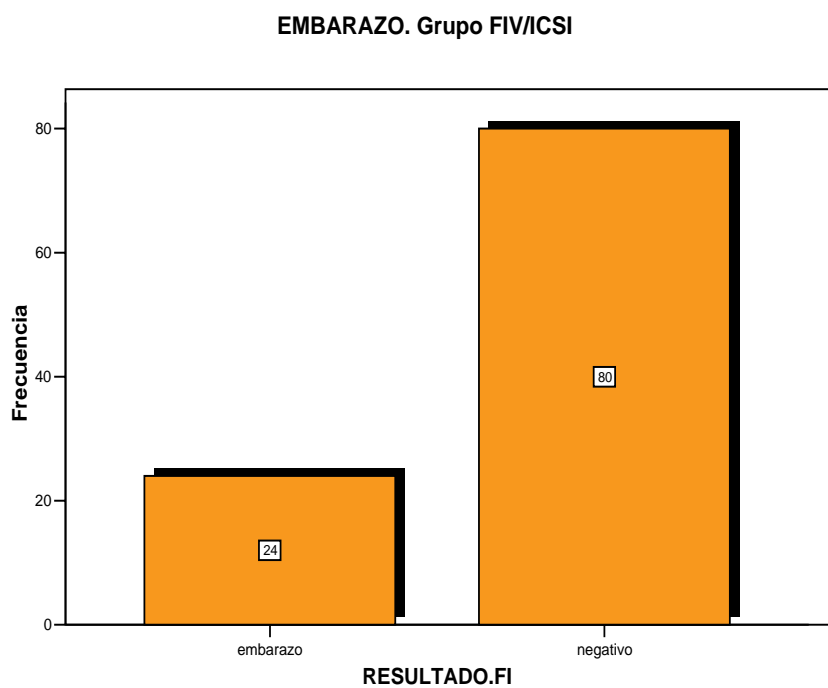
	N	Suma	Media	Desv.Estandar
OVOCITOS FIV	104	587	5.64	2.872
EMBRIONES 2 PRONUCLEOS EN DIA 1	104	375	3.61	2.383
EMBRIONES POLISPERMICOS	104	38	.37	.725
PRONUCLEOS ARRESTADOS	104	15	.14	.353
EMBRIONES CLIVADOS	104	321	3.09	2.128
EMBRIONES CLIVADOS ARRESTADOS	104	114	1.10	1.628
EMBRIONES EN 4 CELULAS EN DIA 2	104	196	1.88	1.560
EMBRIONES EN 8 CELULAS EN DIA 3	104	56	.54	.835

TABLA 10. EVOLUCIÓN DE LOS OVOCITOS SOMETIDOS A FIV, DENTRO DEL GRUPO 2

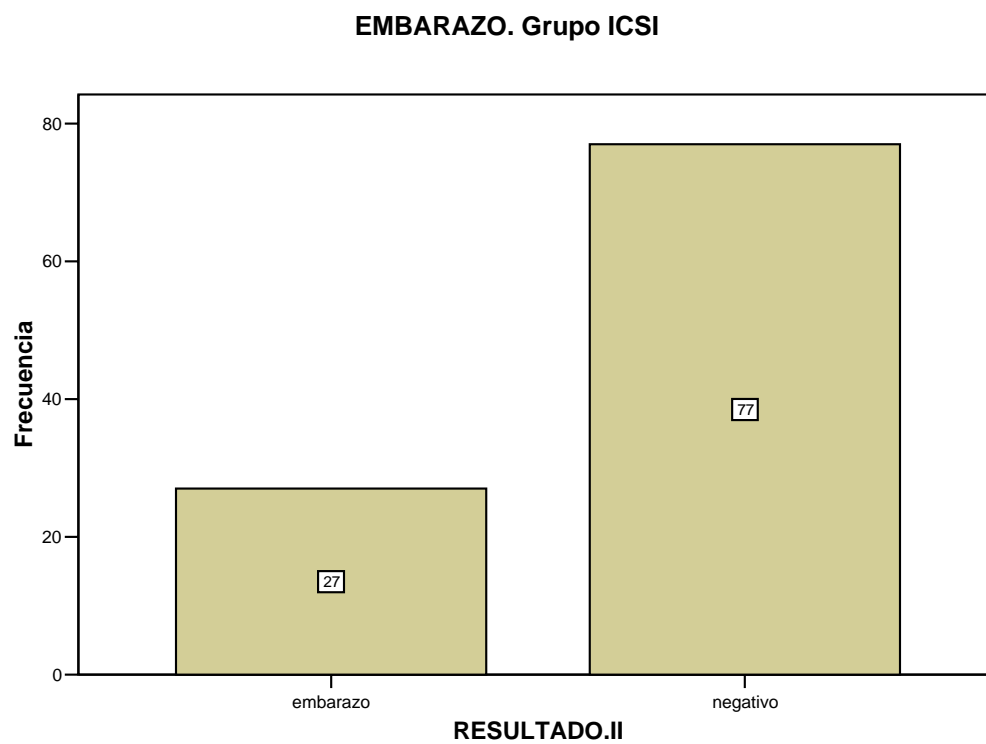
GRUPO 2. ICSI

	N	Suma	Media	Desv.Estandar
OVOCITOS ICSI	104	1138	10.94	5.051
EMBRIONES 2 PRONUCLEOS EN DIA 1	104	902	8.67	4.650
EMBRIONES POLISPERMICOS	104	42	.40	.676
PRONUCLEOS ARRESTADOS	104	9	.09	.283
EMBRIONES CLIVADOS	104	784	7.54	3.909
EMBRIONES CLIVADOS ARRESTADOS	104	244	2.35	2.460
EMBRIONES EN 4 CELULAS EN DIA 2	104	513	4.93	3.063
EMBRIONES EN 8 CELULAS EN DIA 3	104	199	1.91	2.402

TABLA 11. EVOLUCIÓN DE LOS OVOCITOS SOMETIDOS A ICSI, DENTRO DEL GRUPO 2



GRÁFICA 3. EMBARAZOS EN EL GRUPO 2



GRÁFICA 4. EMBARAZOS EN EL GRUPO 1

BIBLIOGRAFÍA

1. Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1994; 9: 511-518.
2. Nagy ZP, Liu J, Joris H. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1994; 9: 1743-1748.
3. Nakano Y, Shirakawa H, Mitsuhashi N. Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Mol Hum Reprod.* 1997; 3: 1087-1093.
4. Ramalho-Santos J, Sotovsky P, Simerly C, Oko R. ICSI choreography: fate of sperm structures after monospermic rhesus ICSI and first cell cycle implications. *Human Reprod.* 2000; 15 (12): 2610-2620.
5. Yanagida K, Katayose H, Hirata S. Influence of sperm immobilization on onset of Ca oscillations after ICSI. *Hum Reprod.* 2001; 16: 148-152.
6. Williams CJ. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human Reprod Update.* 2002; 8 (4): 313-321.
7. Dale B, Elder K. *IVF.* 1997. Cambridge University Press: 15-53.
8. Evans JP. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum Reprod Update.* 2002; 8 (4): 297-311.
9. Yanagimachi R. The physiology of reproduction. Mammalian fertilization. In Knobil, E. and Neill JD. Eds. Raven Press Ltd. New York, USA: 189-317.
10. Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update.* 2002; 8 (4): 323-331.
11. Sutovsky P, Oko R, Hewitson L, Schatten G. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with bovine oocyte surface during fertilization. *Dev Biol.* 1997; 188 (1): 75-84.
12. Schatten G. Cytoskeletal aspects of Assisted fertilization. *Seminars in Reproductive Medicine.* 2000; 18 (2): 151-159.
13. Sutovsky P, Hewitson L, Simerly CR. Intracytoplasmic sperm injection for rhesus monkey fertilization results in unusual chromatin, cytoskeletal and membrane events, but eventually leads to pronuclear development and sperm aster assembly. *Human Reprod.* 1996; 11: 1703-1712.
14. Tarin JJ, Perez-Albala S, Aguilar A, Minarro J, Cano A. Long-term effects of posovulatory aging of mouse oocytes on offspring: a two-generational study. *Biol Reprod.* 1999; 61: 1347-1355.
15. Terada Y, Luetjens CM, Sutovsky P, Schatten G. Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: Does it introduce chromosomal anomalies? *Fertil Steril.* 2000; 74 (3): 454-460.
16. Bonduelle M, Wilikens A. A follow up study of children born after ICSI with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod.* 1998; 13 (1): 196-207.

17. Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A. Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod.* 1996; 11 (4):131-155.
18. Tarlatzis BC, Bili H. Survey on intracytoplasmic sperm injection: report from the ESHRE ICSI Task Force. *Human Reprod.* 1998; 13 (Suppl 1): 165-177.
19. Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M. Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum Reprod.* 2000; 15 (7): 1592-1596.
20. Dumoulin JCM, Coonen E., Bras M. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000; 15 (2): 402-409.
21. Fishel S, Aslam I, Lisi F. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Hum Reprod.* 2000; 15 (6): 1278-1283.
22. Oehninger S, Gosden RG. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Hum Reprod.* 2002; 17 (9): 2237-2242.
23. Ola B., Afnan M, Sharif K. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Hum Reprod.* 2001; 16 (12): 2485-2490.
24. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340(8810): 17-8.
25. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC.: Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994; 62(3): 639-41.
26. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al.: The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995; 10(5): 1123-9.
27. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P.: High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995; 10(1): 148-52.
28. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Sattar MA, Amin YM.: Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization for sibling oocytes in cases of unexplained infertility and borderline semen. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13(1): 38-42.
29. Fishel S, Aslam I, Lisi F, Rinaldi L, Timson J, Jacobson M, et al.: Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Hum Reprod* 2000; 15(6): 1278-83.
30. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Amin YM, Kamal A.: Prospective controlled randomized study of in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in the treatment of tubal factor infertility with normal semen parameters. *Fertil Steril* 1996; 66(5): 753-6.
31. Ruiz A, Remohi J, Minguez Y, Guanes PP, Simon C, Pellicer A.: The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1997; 68(1): 171-3.
32. Baker HW. Marvellous ICSI.: the viewpoint of a clinician. *Int J Androl* 1998; 21(5): 249-52.

33. Bourne H, Richings N, Harari O, Watkins W, Speirs AL, Johnston WI, et al.: The use of intracytoplasmic sperm injection for the treatment of severe and extreme male infertility. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(2): 237-45.
34. Hamberger L, Lundin K, Sjogren A, Soderlund B.: Indications for intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 1: 128-33.
35. Mansour R.: Intracytoplasmic sperm injection: a state of the art technique. *Hum Reprod Update* 1998; 4(1): 43-56.
36. Payne D, Flaherty SP, Jeffrey R, Warnes GM, Matthews CD.: Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9(11): 2051-7.
37. Oehninger S, Kruger TF, Simon T, Jones D, Mayer J, Lanzendorf S, et al.: A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with severe teratozoospermia undergoing in-vitro fertilization with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11(5): 1086-9.
38. Fishel S, Lisi F, Rinaldi L, Lisi R, Timson J, Green S, et al.: Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus high insemination concentration (HIC) for human conception in vitro. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(2):169-74; discussion 174-5.
39. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Amin YM.: The role of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the treatment of patients with borderline semen. *Hum Reprod* 1995; 10(11): 2829-30.
40. Verheyen G, Tournaye H, Staessen C, De Vos A, Vandervorst M, Van Steirteghem A.: Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14(9): 2313-9.
41. World Health Organization.: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999.
42. Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W.: In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril* 1998; 70(2): 305-14.
43. Host E, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F: Sperm morphology and IVF: embryo quality in relation to sperm morphology following the WHO and Kruger's strict criteria. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; 78(6): 526-9.
44. Kiefer D, Check JH, Katsoff D.: The value of motile density, strict morphology, and the hypoosmotic swelling test in in vitro fertilization-embryo transfer. *Arch Androl* 1996; 37(1): 57-60.
45. Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem AC.: 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.
46. Ombelet W, Menkveld R, Kruger TF, Steeno O.: Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Hum Reprod Update* 1995; 1(6): 543-57.
47. Ombelet W, Wounters E, Boels L, Cox A, Janssen M, Spiessens C, et al.: Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of WHO strict criteria in a fertile and a subfertile population. *Int J androl* 1997; 20(6): 367-372.

48. Zollner U, Schleyer M, Steck T.: Evaluation of a cutoff value for normal sperm morphology using strict criteria to predict fertilization after conventional in-vitro fertilization and embryo transfer in asthenozoospermia. *Hum Reprod* 1996; 11(10): 2155-61.
49. Benoff S, Cooper GW, Paine T, Hurley IR, Napolitano B, Jacob A, et al.: Numerical dose-compensated in vitro fertilization inseminations yield high fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril* 1999; 71(6): 1019-28.
50. Roest J, Van Heusden AM, Zeilmaker GH, Verhoeff A.: Treatment policy after poor fertilization in the first IVF cycle. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15(1): 18-21.
51. Ubaldi F, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A, et al.: Indications for and results of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Int J Androl* 1995; 18 Suppl 2: 88-90.
52. Coates TE, Check JH, Choe J, Nowroozi K, Lurie D, Callan C.: An evaluation of couples with failure of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1992; 7(7): 978-81.
53. Lipitz S, Rabinovici J, Ben-Shlomo I, Bider D, Ben-Rafael Z, Mashiach S, et al.: Complete failure of fertilization in couples with unexplained infertility: implications for subsequent in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 1993; 59(2): 348-52.
54. Molloy D, Harrison K, Breen T, Hennessey J.: The predictive value of idiopathic failure to fertilize on the first in vitro fertilization attempt. *Fertil Steril* 1991; 56(2): 285-9.
55. 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 indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2001; 75(2): 342-7.
56. Kastrop PM, Weima SM, Van Kooij RJ, Te Velde ER.: Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization (IVF) with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt. *Hum Reprod* 1999; 14(1):65-9.
57. Benadiva CA, Nulsen J, Siano L, Jennings J, Givargis HB, Maier D.: Intracytoplasmic sperm injection overcomes previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999; 72(6): 1041-4.
58. Ludwig M, al-Hasani S, Kupker W, Bauer O, Diedrich K.: A new indication for an intracytoplasmic sperm injection procedure outside the cases of severe male factor infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 75(2): 207-10.
59. Mandelbaum J, Antoine JM, Plachot M, Belaisch-Allart J, Salat-Baroux J.: [Are there indications for intra-cytoplasmic sperm injection in female infertility?]. *Contracept Fertil Sex* 1997; 25(7-8): 607-10.
60. Tomas C, Orava M, Tuomivaara L, Martikainen H.: Low pregnancy rate is achieved in patients treated with intracytoplasmic sperm injection due to previous low or failed fertilization in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13(1): 65-70.
61. Moreno C, Ruiz A, Simon C, Pellicer A, Remohi J: Intracytoplasmic sperm injection as a routine indication in low responder patients. *Hum Reprod* 1998; 13(8): 2126-9.
62. Ziebe S, Andersen AN, Andersen AG, Mikkelsen AL, Lindenberg S: Results of intracytoplasmic sperm injection in relation to indication. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76(4):335-9.

63. Takeuchi S, Minoura H, Shibahara T, Shen X, Futamura N, Toyoda N: In vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection for couples with unexplained infertility after failed direct intraperitoneal insemination. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17(9): 515-20.
64. Ashkenazi J, Orvieto R, Gold-Deutch R, Feldberg D, Dicker D, Voliovitch I, et al.: The impact of woman's age and sperm parameters on fertilization rates in IVF cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 66(2): 155-9.
65. Abdelmassih R, Sollia S, Moretto M, Acosta AA.: Female age is an important parameter to predict treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1996; 65(3): 573-7.
66. Oehninger S, Veeck L, Lanzendorf S, Maloney M, Toner J, Muasher S.: Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors. *Fertil Steril* 1995; 64(5): 977-81.
67. Bar-Hava I, Orvieto R, Ferber A, Ashkenazi J, Dicker D, Ben-Rafael Z.: Standard in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in advanced female age—what may be expected? *Gynecol Endocrinol* 1999; 13(2): 93-7.
68. Lahteenmaki A, Reima I, Hovatta O.: Treatment of severe male immunological infertility by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; 10(11): 2824-8.
69. Francavilla F, Romano R, Santucci R, La Verghetta G, D'Abrizio P, Francavilla S.: Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and implications for treatment. *Front Biosci* 1999; 4:E9-E25.