

Análisis de los resultados de ciclos de FIV-ICSI en parejas que no gestan tras cuatro inseminaciones.

Analysis of the results of cycles of IVF-ICSI in no pregnant couples after four intrauterine inseminations

Gil Raga F, Monzó A, Peinado I, Gil Gracia F, Cabo A, Romeu A.

Servicio de Ginecología (Reproducción Humana) Hospital Universitario La Fe. Valencia. España

Resumen

Objetivo: El presente estudio evalúa la capacidad fecundante de los espermatozoides de parejas diagnosticadas de esterilidad, con factor masculino normal según criterios de OMS o astenospermia leve que se habían sometido a 4 ciclos de IAC fallidas. Diseño: Estudio longitudinal prospectivo y analítico de 1 año de duración. Material y métodos: Fueron seleccionadas 58 parejas estériles tras fallo de 4 IAC. Se practicó un total de 84 ciclos de hiperestimulación ovárica controlada para la realización de una FIV. De los ovocitos obtenidos en cada ciclo, aleatoriamente la mitad se inseminó con técnica de FIV clásica y la otra mitad con ICSI. Resultados: En el estudio se recuperaron un total de 806 ovocitos. Se emplearon 673 ovocitos, 358 se inseminaron con una técnica de FIV clásica y 315 se microinyectaron mediante ICSI. Fecundaron un total de 416 ovocitos (61,8%) La tasa de fecundación de FIV fue 43,6% y la de ICSI 82,5%. El fallo total de fecundación en FIV fue del 38%. Con ICSI no se obtuvo ningún fallo total de fecundación. Se evaluaron los distintos criterios morfológicos del semen en relación a los resultados obtenidos en ambas técnicas. La tasa de fecundación en FIV mostró una correlación significativa con la concentración del semen capacitado ($r=0,4$, $p=0,001$), con la motilidad del semen capacitado ($r=0,2$, $p=0,049$) y con el REM ($r=0,426$, $p=0,000$). La tasa de fecundación en ICSI no mostró correlación significativa con ningún parámetro. Conclusiones: La capacidad fecundante de los espermatozoides está disminuida en pacientes con diagnóstico de esterilidad de origen desconocido y parámetros seminales normales. Unido al hallazgo de un fallo total de fecundación del 38% en los ovocitos sometidos a FIV clásica, nos debe replantear la indicación de realizar ICSI en aquellas parejas en las que no encontramos una causa de esterilidad y han fallado 4 inseminaciones intrauterinas homólogas.

Palabras clave: Esterilidad de origen desconocido. Inseminación artificial. Fecundación in vitro. ICSI

Correspondencia: Dr. Alberto Romeu
Servicio de Ginecología (Reproducción Humana)
Hospital Universitario La Fe
Avda. Campanar, 21
46009, Valencia
e-mail: romeu_alb@gva.es

Summary

Objective: This study evaluates the sperm fecundating ability of couples with sterility diagnosis, with normal male factor (OMS criteria) that failed 4 cycles of intrauterine insemination. Study design: One year length prospective analytical study. Material and methods: 58 no pregnant couples were selected after 4 intrauterine insemination failure. 84 ovarian hyperstimulation cycles were controlled for a classical IVF. The oocytes obtained were randomized inseminated with a classical IVF and microinjected with ICSI. Results: 806 oocytes were retrieved. There were used 673 oocytes, 358 used for IVF and 315 used for ICSI. A total of 416 oocytes fertilized (61,8%) the IVF fecundation rate was 43,6% and the ICSI fecundation rate was 82,5%. The IVF total fertilization failure was 38%. No total fecundation failure was obtained with ICSI. Seminal morphological parameters were evaluated with both techniques. IVF fecundation rate showed a significant correlation with the concentration of capacitated semen ($r=0.4$, $p=0.001$) with the motility of capacitated semen ($r=0.2$, $P=0.049$) and with the MSC ($r=0.426$, $p=0.000$). The ICSI fecundation rate not showed significant correlation with any parameter. The ability of the spermatozoas for fertilization is decreased in patients with unknown origin sterility and normal seminal parameters, joined to the finding of a total fecundation failure in 38% of IVF oocytes, must make us raise again the ICSI as an indication for those couples with unknown origin sterility and 4 intrauterine insemination failure.

Key words: Idiopathic infertility. Artificial insemination. In vitro fertilization. ICSI

INTRODUCCIÓN

La inseminación de los ovocitos en el laboratorio ha permitido resolver problemas de esterilidad, obteniendo resultados satisfactorios en los casos de obstrucción tubárica, endometriosis y esterilidad de origen desconocido con semen normal (1) Pero cuando el espermiograma presenta parámetros anormales según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2), los métodos para mejorar las tasas de fecundación (3) sólo han sido eficaces en los casos de alteración moderada con un número suficiente de espermatozoides móviles progresivos para la fecundación de los ovocitos.

Al final de la década de los 80, diversas técnicas de micromanipulación fueron descritas con mejor o peor resultado (4) hasta que la microinyección intracitoplasmática ha supuesto una revolución en el mundo de la reproducción asistida.

Las tasas de gestación que se han conseguido en ICSI en casos de patología seminal grave, han sido satisfactorias (4-6) y se ha reducido al mínimo hasta casi desaparecer por completo, el fallo total de fecundación.

Puede afirmarse que con la introducción de la ICSI como técnica rutinaria en los laboratorios de FIV, se puede lograr la fecundación ovocitaria con cualquier muestra seminal que contenga espermatozoides, más aún, se pueden obtener embarazos de varones azoospermicos, mediante la fecundación del ovocito con espermatozoides obtenidos de biopsia testicular (BT) o aspirado de epidídimo (AE) (7)

El presente estudio se planteó evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides de parejas diagnosticadas de esterilidad con factor masculino normal o leve según criterios de OMS que se habían sometido a 4 ciclos de IAC fallidas, mediante la realización de una técnica de FIV clásica a la mitad de los ovocitos obtenidos y una ICSI a la otra mitad.

Para determinar la efectividad del semen para fecundar ovocitos, evaluamos no solo las tasas de fecundación, gestación, implantación y tasa de recién nacido sano en ambas técnicas, sino también otras características diferenciales de los embriones obtenidos con cada una de las técnicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio longitudinal prospectivo y analítico de 1 año de duración, tomando como muestra parejas tratadas por esterilidad en el Servicio de Reproducción Humana del Hospital La Fe de Valencia.

Fueron seleccionadas 58 parejas estériles que no obtuvieron gestación tras haber sido sometidas a 4 ciclos de inducción de la ovulación (IO) con gonadotropinas e inseminación intrauterina con semen conyugal capacitado (IAC) según protocolo descrito previamente (25). En estas pacientes se practicó un total de 84 ciclos de hiperestimulación ovárica controlada para la realización de una FIV. De los ovocitos obtenidos en cada ciclo, aleatoriamente la mitad se inseminó con técnica de FIV clásica y la otra mitad con ICSI. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado.

Los diagnósticos de esterilidad por los que se recurrió a inseminaciones intrauterinas se describen en la tabla 1.

Tabla 1

*Diagnósticos de esterilidad de las parejas. * Según criterios de la AFS*

Diagnóstico de la mujer	
Anovulación	10
Endometriosis I II*	7
Fase lútea inadecuada	10
Lesión Tubárica unilateral	9
Función reproductora normal	17
Diagnóstico del hombre**	
Astenozoospermia leve	16
Seminograma normal	45
** Según criterios de la OMS	

La estimulación con gonadotrofinas se inició el tercer día del ciclo menstrual, bajo supresión hipofisaria mediante la administración de un agonista de la GnRH en protocolo largo. La totalidad de los ciclos fueron estimulados con FSH recombinante (Folotropina α o β), a dosis inicial variable (150/450 UI /d) en función de las características de la paciente. Esta dosis pudo ser modificada en el curso de la estimulación en función de la respuesta individual.

La respuesta se evaluó mediante el control periódico de los niveles de estradiol circulante producidos por los folículos en crecimiento y el número total y el tamaño de los folículos medidos por ultrasonografía vaginal cada 24-48 h.

El objetivo mínimo fue conseguir el desarrollo de al menos 4 folículos preovulatorios junto a niveles de estradiol de alrededor de 200 pg/ml por folículo mayor de 16 mm. Una vez alcanzado este nivel de desarrollo folicular se administró una dosis única de entre 5000 y 10000 UI de hCG para inducir la madurez final del ovocito.

Para evitar los riesgos médicos significativos de la hiperestimulación ovárica se consideró cancelar el ciclo y no administrar hCG si se observaba por ecografía más de 25 folículos o cifras de estradiol total superiores a 3500 pg/ml.

Se canceló el ciclo a aquellas pacientes en las que tras dosis acumulativas máximas de 600 UI/día de FSH no se obtenía crecimiento de más de 3 folículos por encima de 14 mm de diámetro o de estradiol superior a 300 pg/dl.

La recuperación de los ovocitos se produjo 36 ho-

ras después de la administración de la hCG. La captación de los ovocitos se realizó en quirófano, mediante punción-aspiración con agujas de calibre 17G, transvaginalmente, guiada por ecografía y bajo sedación de la paciente. Fueron sistemáticamente puncionados y aspirados todos los folículos con un diámetro superior a 13 mm.

Los ovocitos recuperados fueron clasificados en: atrésicos, zona rota, metafase II (M-II), metafase II / Postmaduros (M-II/PM), metafase I maduros (M-I/m), metafase I inmaduros (M-I/i) y Profase (PF).

En ningún caso se inseminaron o microinyectaron ovocitos atrésicos, con la zona pelúcida rota, en metafase I inmaduros o en Profase. Tan solo se recuperaron para su fecundación los ovocitos en metafase II, metafase II / Postmaduros y los metafase I maduros.

Una vez cultivados se distribuyeron aleatoriamente y aproximadamente la mitad de ellos fueron sometidos a un proceso de fecundación in vitro (FIV) clásica y la otra mitad a una técnica de inyección intracitoplasmática (ICSI)

Los embriones cultivados fueron clasificados según el número de blastómeras y los grados de fragmentación de acuerdo a los criterios de Veeck. A las 36 horas posteriores a la inseminación se contó el número de blastómeras que presentaba cada embrión fecundado, agrupándose en <4, 4 y >4 blastómeras. Los grados de maduración embrionaria fueron otorgados en función del porcentaje de fragmentación. En el grado 1, los embriones son normales sin fragmentación, los grados 2 y 3 muestran crecientes anomalías y están muy deformados en el grado 4.

Los embriones obtenidos fueron transferidos a las 48 horas después de la recuperación. Se transfirieron entre 1 y 4 embriones en función de las características del embrión y la edad de la paciente. La transferencia intrauterina de embriones se realizó mediante un catéter de Cook.

Se reforzó la fase lútea mediante el empleo de comprimidos de progesterona por vía vaginal a dosis de 400 mg/d. Se determinó los niveles en sangre de estradiol y progesterona los días -2, -1, 0 (día de la punción) y +2.

Se determinó los niveles séricos β -hCG dos semanas después de la transferencia. Niveles de β -hCG mayores de 20 mu/ml se consideraron indicativos de embarazo. Cuando se observó latido fetal por ultrasonografía en las cinco primeras semanas de embarazo, se consideró gestación.

Han sido considerados para el estudio los siguientes parámetros: Características del semen: concentración y motilidad en fresco y capacitado y REM. Se analizaron el número de embriones de buena calidad

transferidos, la tasa de fecundación en FIV, la tasa de fecundación en ICSI, así como la tasa de gestación según fueron obtenidos los embriones de una u otra técnica.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS® versión 10.0 para Windows®. Para el análisis descriptivo de las variables cuantitativas se expresaron como la media y la desviación estándar. Cuando se practicó el análisis estadístico comparando variables cuantitativas se utilizó el test t de Student y cuando fueron cualitativas, el test de (2. Cuando se buscó una relación entre dos variables independientes se utilizó test de Pearson y la ecuación de regresión lineal.

RESULTADOS

Las características clínicas consideradas (edad, índice de masa corporal y años de evolución de la esterilidad se recogen en la tabla 2.

Tabla 2
Característica físicas de las parejas

	Media ± DT
Edad de la mujer (años)	33,4 ± 2,9
Edad del hombre (años)	35,3 ± 3,3
Años esterilidad	6,5 ± 2,4
IMC (Kg/m ²)	22,6 ± 2,6

Las características básicas del semen de los pacientes estudiados se exponen en la tabla 3.

La media de días de estímulo fue 9,3±1,7, los niveles medios de estradiol determinados el día de la administración de hCG fueron 1858,1±614,05 pg/ml. La dosis total media de gonadotrofinas fueron 1807,3±1364,7 mUI/ml, la media de días de fase folicular fue 13,8±2,2, la media de días de fase lútea fue 15,3±1,8. El número total medio de folículos > 15 mm obtenidos fue 10,8 ± 4,8, la media del diámetro

Tabla 3
Características básicas del semen

Características	Valores
Concentración fresco	47,4 ± 23,5 mill/ml
Motilidad fresco	22,5 ± 7,4 %
Concentración capacitado	46,1 ± 22,4 mill/ml
Motilidad capacitado	78,4 ± 7,6 %
REM	36,5 ± 18,6 mill/ml

del folículo mayor fue 21,6±1,6 mm. la media de la línea endometrial fue de 11,7±2,1 mm.

En el estudio se canceló 13 ciclos (32,5%), 6 por baja respuesta a la estimulación y 7 por riesgo de hiperestimulación.

En el estudio se recuperó un total de 806 ovocitos, es decir una media de 13,9±5,6 ovocitos por ciclo. Las características de los ovocitos recuperados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4
Recuperación ovocitaria

Recuperación ovocitaria			
	Total (media±dt)		Total (media±dt)
Metafase II	515 (63,8%)	Profase	43 (5,3%)
Metafase II /PM	55 (6,8%)	Atrésicos	49 (6,1%)
Metafase I mad	53 (6,5%)	Zona rota	33 (4,1%)
Metafase I inmad	61 (7,5%)	Total	806

Se emplearon 673 ovocitos, 358 se inseminaron con una técnica de FIV clásica y 315 se microinyectaron mediante ICSI. Fecundaron un total de 416 ovocitos (61,8%) La tasa de fecundación de aquellos ovocitos procedentes de FIV fue 43,6% y la de aquellos procedentes de ICSI 82,5%. El fallo total de fecundación en FIV fue del 38%. Con ICSI no se obtuvo ningún fallo total de fecundación. En la tabla 5 están representados estos datos.

El criterio de selección de embriones para la transferencia se realizó en función de su calidad morfológica, independientemente de la técnica de fecundación. En caso de presentar un aspecto morfológico similar fueron seleccionados embriones procedentes de FIV clásica.

Del total de embriones obtenidos, 168 fueron transferidos, de ellos 38 fueron obtenidos tras técnica de FIV y 130 lo fueron mediante ICSI. Los embrio-

Tabla 5
Total de ovocitos fecundados y tasas de fecundación por ovocito en FIV y en ICSI

	Total (%)
Total ovocitos fecundados	416 (61,8%)
Ovocitos fecundados FIV	156 (43,6%)
Ovocitos fecundados ICSI	260 (82,5%)
Fallo total FIV (parejas)	21(38%)
Fallo total ICSI (parejas)	0

nes transferidos fueron clasificados según el número de células y el grado de fragmentación y el número de las blastómeras de acuerdo a los criterios de Veeck. La clasificación de los embriones transferidos se expone en la tabla 6.

Tabla 6
Clasificación de los embriones obtenidos.

Resultado embriones			
Nº células	Embriones	Maduración	Embriones
<4 células	30	Grado I	68
4 células	125	Grado II	60
>4 células	13	Grado III	39
		Grado IV	1

La clasificación de los embriones transferidos la resumimos combinando los dos criterios en embriones de buena calidad, aquellos que tenían 4 o más células y grado 1 ó 2 morfológico, y los de mala calidad, es decir los que tenían <4 células y grados 3 ó 4 de morfología. Los resultados fueron 112 embriones de buena calidad y 56 de mala.

La fase lútea duró una media de $16 \pm 2,1$ días, en aquellas pacientes que no quedaron gestantes. La figura 1 muestra la evolución de las medias de las determinaciones de estradiol y progesterona los días -2, -1, 0 y +2 del ciclo.

Se obtuvo 16 gestaciones y la tasa de gestación por ciclo finalizado en estas pacientes fue de 27,6%. Se obtuvieron 7 gestaciones con un solo saco, 6 gestaciones gemelares y 2 gestación triple. No se obtuvieron gestaciones de mayor orden. Nacieron 3 neonatos de gestaciones simples, 8 gemelos y 3 trillizos. La tasa de aborto fue 13,5 %por ciclo.

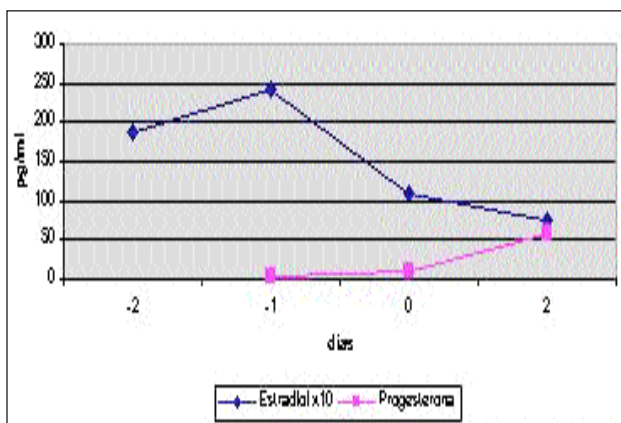


Figura 1

Niveles de estradiol y progesterona durante la fase lútea.

Mediante el uso del análisis de correlación de Pearson, se intentó evaluar los distintos criterios morfológicos del semen en relación a los resultados obtenidos en ambas técnicas. Las variables estudiadas en el semen fueron motilidad y concentración en fresco, motilidad y concentración tras capacitación con técnica de swim up y Recuento espermático móvil (REM) tras capacitación.

Puesto que la técnica de FIV clásica precisa de una buena motilidad y un número adecuado de espermatozoides tras capacitación para poder penetrar el ovocito, se analizó la existencia de posibles correlaciones entre los criterios descriptivos básicos del seminograma y la capacidad fecundante del espermatozoide, mediante la realización de un análisis de regresión lineal. Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las variables: Tasa de fecundación en FIV; Concentración en fresco; Motilidad en fresco; Concentración capacitado; Motilidad capacitado; REM. (tabla 7)

Tabla 7

Tasa de fecundación en FIV; Concentración en fresco; Motilidad en fresco; Concentración capacitado; Motilidad capacitado; REM

Tasa de fecundación FIV		
	p	r
Concentración fresco	> 0,05	
Motilidad fresco	> 0,05	
Concentración capacitado	0,001	0,4
Motilidad capacitado	0,049	0,2
REM	0,000	0,426

La tasa de fecundación en FIV mostró una correlación significativa con la concentración del semen capacitado ($r=0,4$, $p=0,001$), con la motilidad del semen capacitado ($r=0,2$, $p=0,049$) y con el REM ($r=0,426$, $p=0,000$). No se evidenció correlaciones significativas entre la tasa de fecundación en FIV y la concentración y la motilidad del semen en fresco.

A pesar de que los coeficientes de correlación no fueron mayores a 0,75, se hizo una estimación curvilínea con el fin de determinar la tendencia de estas variables.

Para las tres variables que correlacionaron significativamente (concentración capacitado, motilidad capacitado y REM), el modelo lineal mejoró la estimación, comparado con el ajuste exponencial, y estos modelos fueron significativos ($p=0,000$), aunque los coeficientes de determinación fueron bajos, siendo el mayor de todos ellos el del REM (0,182) Esto signifi-

ca que menores valores de REM podrían ser predictivos de una baja tasa de fecundación en FIV.

La figura 2 representa los modelos de estimación lineal y exponencial de la variable dependiente Tasa de fecundación FIV con la variable REM.

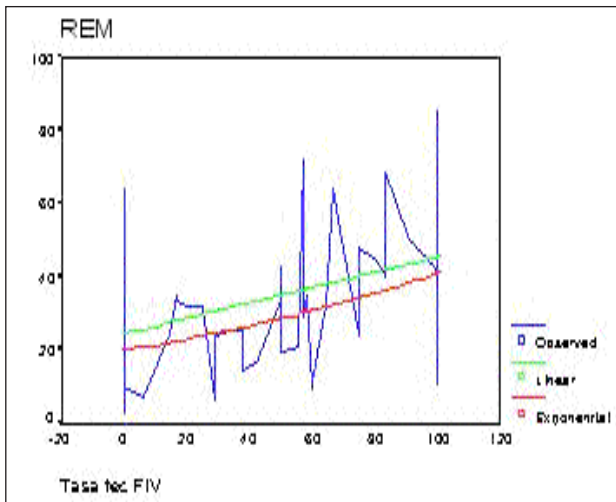


Figura 2

Modelos de estimación lineal y exponencial de la variable dependiente tasa de fecundación FIV con la variable REM

Para el análisis estadístico de la calidad embrionaria respecto a la tasa de gestación, se empleó la prueba de χ^2 para comparar variables no paramétricas. El test de χ^2 mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,022$) en función del número de embriones de buena calidad transferidos. En la tabla 8 se describen los resultados obtenidos.

Se realizó un análisis de correlación de Pearson, entre la tasa de fecundación en FIV y el número de embriones de buena calidad transferidos, observando una correlación significativa entre estas variables ($r=0,343$, $p=0,014$) aunque con una pendiente débilmente positiva. Es decir cuantos más embriones de buena calidad se transfirieron, mejores tasas de gestación se consiguieron.

Por último se analizó mediante test de (2 la tasa de gestación en función de la procedencia de los embri-

Tabla 8

Tasa de embarazo que se consiguió cuando se transfirieron embriones de buena calidad

Nº de embriones de buena calidad transferidos				
	0	1	2	3
% Gestación	11,8	11,8	5,9	70,6
χ^2 : 0,022				

nes transferidos (FIV, ICSI y FIV+ICSI) Aunque las diferencias observadas no mostraron diferencias significativas, la tasa de gestación cuando se transfirieron embriones procedentes solo de FIV fue menor. Los resultados se presentan en la tabla 9.

Tabla 9

Análisis de la tasa de gestación en función de la procedencia de los embriones transferidos

	Gest	n	Tasa de gest
Transf. FIV	1	6	16,7%
Transf.. FIV+ICSI	4	15	29,4%
Transf. ICSI	16	37	43,2%
χ^2 : no significativo			

DISCUSIÓN

El principal hallazgo de este estudio es la evidencia de una diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$), entre las tasas de fecundación en FIV (43,6%) y en ICSI (82,5%) Este dato pone de manifiesto que existe un déficit en la capacidad fecundante de los espermatozoides de pacientes diagnosticados de esterilidad de origen desconocido. De los parámetros que utilizamos para diagnosticar un semen, tan solo el REM guardó una correlación positiva con la tasa de fecundación en FIV($r=0,426$).

En uno de los trabajos revisados (13), se estudiaron 73 parejas con esterilidad de origen desconocido y 7 con endometriosis de grado moderado que se sometieron a técnicas de FIV tras fallar 4 inseminaciones uterinas. Los ovocitos obtenidos fueron aleatoriamente sometidos a FIV o a ICSI. Los resultados del estudio concluyen que no existe evidencia significativa entre las tasas de fecundación en FIV (54,0%) y en ICSI (60,4%) aunque son mayores en ICSI. Dichos resultados difieren de los obtenidos en este estudio.

En otro artículo, (14) se revisaron las tasas de fecundación en FIV y en ICSI en 20 pacientes con diagnóstico seminal de astenozoospermia, definiéndola como la presencia de menos del 5% de formas móviles en el semen en fresco. El estudio demostró que existen diferencias estadísticamente significativa entre las tasas de FIV (22,9%) e ICSI (63,4%), concluyendo que en presencia de seminogramas catalogados como astenozoospermicos severos, debe optarse por técnicas de ICSI.

Sin embargo en otro artículo (16) en el que se estudió a 35 pacientes sin criterios de esterilidad masculina, se compararon las tasas de fecundación en FIV (57,2%) y en ICSI (71,3%) y resultó que existía

una diferencia estadísticamente significativa a favor de la microinyección ($p < 0,05$), esto pone de manifiesto que incluso ante pacientes con seminogramas normales, la ICSI ofrece mejores resultados que la FIV.

En todos los artículos revisados (13-24), el déficit total de fecundación siempre fue mayor cuando se usó FIV que cuando se empleó ICSI, como ocurre en nuestro estudio.

Las tasas de gestación, implantación, aborto y recién nacido sano del presente estudio, fueron similares a las consultadas en la literatura.

En nuestro caso, la tasa de gestación en embriones obtenidos exclusivamente con FIV (16,7%) fue menor que la de los obtenida tras ICSI (43,2%), aunque no fue estadísticamente significativa, debido al poco tamaño de la muestra: FIV (1/6), ICSI (11/37) Este dato es similar al obtenido en uno de los estudios ya mencionados (13), donde no se aprecia significación estadística en las tasas de gestación por técnica.

En resumen se puede concluir que la capacidad fecundante de los espermatozoides está disminuida en pacientes con diagnóstico de esterilidad de origen desconocido y parámetros seminales normales. Los tests que valoran dicha función son de difícil aplicación estudio rutinario de los pacientes subfértiles, por el alto coste económico y material que suponen. Esto, unido al hallazgo de un fallo total de fecundación del 38% en los ovocitos sometidos a una técnica de FIV clásica, debe replantear la indicación de realizar una técnica de ICSI en aquellas parejas en las que no se encuentra una causa de esterilidad y han fallado cuatro inseminaciones intrauterinas homólogas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Stephoe PC, Edwards RG.:** Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 1978; 2:336
2. **World Health Organisation.:** WHO laboratory manual for the examination of a human semen and sperm cervical mucus interaction. Cambridge University Press. Cambridge 1992.
3. **Check HJ, Houndani C, Goldsmith G.:** The use of non micromanipulation techniques for male factor and in vitro fertilization outcome. In: Tesarick J, editor. Male factor in human infertility. Rome Ares-Serono Symposia 1994; 271-286.
4. **Van Rumste MM, Evers JL, Farquhar CM.:** Intracytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilisation in patients with non-male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003; (2):CD001301.
5. **Van Stetireghem AC, Liu J, Joris H, et al.:** Higher succes by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of a 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod*, 1993; 8, 1055-1060.
6. **Van Stetireghem AC, Liu J, Joris H, et al.:** High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reproduction* 1991; 6,1011-1066
7. **Palermo G, Joris H, Derde MP, et al.:** Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection.
8. **Ballesteros A, Mollá, Pérez-Cano I.:** Influencia de la edad de la paciente en la indicación terapéutica de la reproducción asistida. X Congreso nacional de andrología. Mayo 2001.
9. **Cameron IT, O'Shea FC, Rolland JM et al.:** Occult ovarian failure: a syndrome of infertility, regular menses and elevated follicle-stimulating hormone concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986; 67, 1190-1194.
10. **Toner JP, Philput CB, Jones GS, Muasher SJ.:** Basal follicle-stimulation hormone levels is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil Steril* 1991; 55:784-791.
11. **Morgenthaler A, FungMY, Harris DH et al.:** Sperm morphology and in vitro fertilization outcome: A direct comparison of the World Healyh Association an strict criteria methodologies. *Fertil Steril* 64:1177, 1995.
12. **Puissant, F, Van Rysselbergher M, Barlow P.:** Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod*, 1987, 2, 705-708.
13. **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 Jul; 68 (1):171-3.
14. **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 Feb; 75 (2):342-7.
15. **Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF, Schoemaker J.:** Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet*. 2000 Jan 1; 355 (9197):13-8.
16. **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 Sep; 14 (9):2313-9.

17. **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 Oct; 17 (9):515-20.
18. **Repping S, van Weert JM, Mol BW, de Vries JW, van der Veen F.:** Use of the total motile sperm count to predict total fertilization failure in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002 Jul; 78 (1):22-8.
19. **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 Dec; 72 (6):1041-4
20. **Bhattacharya S, Hamilton MP, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, Ghobara T, Braude P, Kennedy R, Rutherford A, Hartshorne G, Templeton A.:** Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2001 Jun 30; 357 (9274):2075-9.
21. **Pandian Z, Bhattacharya S, Nikolaou D, Vale L, Templeton A.:** In vitro fertilisation for unexplained subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002; (2):CD003357.
22. **Wolf JP, Ducot B, Kunstmann JM, Frydman R, Jouannet P.:** Influence of sperm parameters on outcome of subzonal insemination in the case of previous IVF failure. *off. Hum Reprod.* 1992 Nov; 7 (10):1407-13.
23. **Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Amin YM, Ramzi AM.:** The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1995 Nov; 64 (5):982-6.
24. **Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y.:** Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl.* 2002 Jan-Feb; 23 (1):1-8.
25. **Romeu A, Monzó A, Peiró T, Díez E, Peinado JA, Quintero LA.:** Endogenous LH surge versus hCG as ovulation trigger after low-dose highly purified FSH in IUI: Comparison of 761 cycles. *J Assist Reprod Genet,* 1997, 14: 439-445