

Reproducción Asistida

FIV convencional vs. ICSI en bajas respondedoras

IVF vs. ICSI in aging low responder patients

Muñoz J^a, Pellicer J^b, Herrer R^a, Mínguez Y^a, García-Velasco J A^{a,c}

^a IVI-Madrid, Madrid, España. ^b IVI-Alicante, Alicante, España. ^c Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España.

Resumen

Objetivo: Comparar la FIV convencional frente a la ICSI en mujeres mayores de 37 años con menos de 5 ovocitos obtenidos en punción. Material y Métodos: Estudio retrospectivo en el que se incluyen 124 pacientes: 78 de FIV convencional y 46 de ICSI. Empleamos (2 y t-student en el análisis estadístico. Resultados: La tasa de cancelación fue significativamente mayor cuando se hizo ICSI (41.3%) comparada con la FIV convencional (19,2%). También la tasa de fallo de fecundación fue significativamente mayor en ICSI (17,8% vs. 3,9%). En las pacientes en que se realizó ICSI se observa una tendencia hacia un mayor porcentaje de transferencias canceladas aunque las diferencias no fueron significativas. Las tasas de fecundación (66,0% vs. 62,4%) fueron similares. La calidad embrionaria en día 2 y día 3 fue comparable tanto en número de blastómeras como en porcentaje de fragmentación. No se observaron diferencias significativas ni en tasa de gestación ni en tasa de implantación. Conclusiones: Basándonos en nuestros resultados sugerimos que, en pacientes añosas y bajas respondedoras con parámetros seminales normales, la FIV convencional sería la técnica de elección debido a que minimiza los posibles problemas técnicos que pueden tener lugar durante una microinyección, y además reduce el riesgo de dañar a los ovocitos de mala calidad que son más frágiles o tienen una zona pelúcida más resistente.

Palabras clave: Baja respondedora. Edad maternal avanzada. FIV convencional. ICSI. Tasa de cancelación. Fallo de fecundación.

Summary

Objective: The aim of the present study was to compare IVF and ICSI in women older than 37 years old with less than 5 oocytes retrieved. Study design: A retrospective study where 124 patients were included: 78 couples were submitted to conventional IVF and 46 couples to ICSI. We employed (2 and t-test t to performed the statistical analysis. Results: Cancellation rate was significantly higher when

Correspondencia: IVI-Madrid,
c/ Santiago de Compostela nº 88-bajo
28035 Madrid, España.
E-mail: jgvelasco@ivi.es

ICSI procedure (41.3%) was performed compared to conventional IVF (19.2%). Also complete fertilization failure rate was significantly greater in ICSI (17.8% versus 3.9%). When ICSI was carried out in these patients, a trend towards a higher percentage of cancelled embryo transfer was observed although differences were not significant. The fertilization rates (66.0% versus 62.4%) were similar. The embryo quality on day 2 and 3 was comparable in both number of blastomeres and percentage of fragmentation. No significant differences were observed in pregnancy rate or implantation rate. Conclusions: We suggest based on our results that, in aging low responder patients with normal sperm parameters, conventional IVF would be the technique of choice since it reduces possible technical problems that may take place during ICSI, and it also reduces the risk of damaging poor quality oocytes that are more fragile or with a more resistant zona pellucida.

Key words: Low responder. Advanced maternal age. Conventional IVF. ICSI. Cancellation rate. Fertilization failure.

INTRODUCCIÓN

El manejo de las pacientes bajas respondedoras en reproducción asistida es bastante difícil, y sigue siendo un problema importante a la hora de conseguir la gestación. No hay una definición bien establecida ni totalmente aceptada de la baja respondedora, pero lo que sí se conoce es que una pobre respuesta a la estimulación ovárica se debe principalmente a una reserva ovárica disminuida y a una edad materna avanzada. Estas mujeres que responden pobremente a los protocolos de estimulación ovárica normalmente tienen niveles altos de FSH y E₂ en día 3 (1), bajos niveles de inhibina B (2), bajo recuento de folículos antrales (3), y tras estimulación ovárica muestran un pequeño número de folículos desarrollados y bajos niveles de E₂ (4). La prevalencia de las pacientes bajas respondedoras dentro del global de pacientes de reproducción asistida varía entre diferentes autores, desde un 9% (5) a un 24% (6). Debido a esta elevada prevalencia es muy importante saber que tratamiento es el mejor para estas pacientes y así incrementar sus bajas tasas de gestación.

Las decisiones relacionadas con qué técnica utilizar (FIV ó ICSI) necesitan ser cuidadosamente tomadas en este grupo específico de pacientes para reducir la cancelación y optimizar la transferencia embrionaria. Ya sabemos que las tasas de gestación en FIV dependen del número de embriones disponibles y de su calidad (7). Una paciente tiene mayor probabilidad de gestar cuanto mayor sea el número de ovocitos recuperados en la punción, y por tanto, más embriones tengamos para seleccionar. Esta es la razón por la que pacientes con buena respuesta ovárica tiene mejor gestación e implantación que aquellas que tienen baja respuesta ovárica (8). Sin embargo, los resultados en cuanto a gestación difieren dentro de las bajas respondedoras dependiendo de su edad. En pacientes

añosas, la calidad ovocitaria esta comprometida independientemente del número de ovocitos, mientras que pacientes jóvenes con pocos ovocitos no tienen porque tener mala calidad ovocitaria. Van Rooij y colaboradores (9) han comparado recientemente pacientes con elevados niveles de FSH frente a pacientes con edad materna avanzada, mostrando que los niveles elevados de FSH basal son un buen marcador predictivo de ciclos cancelados, pero no de tasas de gestación entre paciente jóvenes. Sin embargo la edad materna avanzada es un predictor de bajas tasas de gestación a pesar de niveles normales de FSH.

Como las bajas respondedoras tienen pocos ovocitos maduros recuperados, la elección de la técnica correcta de fertilización adquiere una gran relevancia. En la práctica clínica diaria, las pacientes con 37 años o más y con menos de 5 ovocitos recuperados son frecuentes. Las dudas surgen cuando los parámetros seminales son normales y ambas técnicas son susceptibles de ser empleadas para fertilizar los ovocitos obtenidos. Algunos estudios (10-11) muestran que no hay diferencias significativas en tasas de fecundación y gestación en pacientes añosas cuando se emplea FIV convencional o ICSI. Como la literatura es escasa recomendando una técnica u otra en este grupo de pacientes, la intención de este estudio es presentar un estudio retrospectivo que compara FIV vs. ICSI en pacientes mayores de 37 años con menos de 5 ovocitos recuperados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

En este estudio realizado a lo largo de un año (Julio 2003-Junio 2004), fueron incluidas 124 pacientes bajas respondedoras de más de 37 años y sin factor masculino. La baja respondedora se definió como

aquella que obtuvo 4 ovocitos o menos tras la punción folicular (12). Se dividieron en 2 grupos de acuerdo al procedimiento de fertilización utilizado: 78 parejas en el grupo de FIV convencional y 46 en el de ICSI. Estos grupos se realizaron en función de las preferencias del coordinador de laboratorio.

La edad media de las mujeres en el grupo de FIV fue de 40,5 mientras que en de ICSI fue de 40,8 años. La FSH basal fue de 8,9 UI/ml en el grupo de FIV y de 8,3 en el de ICSI. Todos los varones presentaban parámetros seminales mínimos admisibles para hacer una FIV convencional según los procedimientos estándar de IVI-Madrid (al menos 15×10^6 espermatozoides/ml, 30% espermatozoides móviles progresivos, y 3% de formas normales).

Estimulación Ovárica

El protocolo de estimulación ovárica controlada ya está descrito anteriormente en diferentes revistas (12). Brevemente, la estimulación ovárica se realizó usando agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHa), gonadotropinas recombinantes (FSHr) y/o HMG. El crecimiento folicular se monitorizó con ultrasonidos, y la maduración final folicular y ovocitaria se indujo con la administración de gonadotropina coriónica humana (HCG) cuando el folículo dominante era > 17 mm de diámetro. 36 horas más tarde se realizó la aspiración folicular mediante aspiración transvaginal ecoguiada. La fase lútea se reforzó con progesterona intravaginal micronizada (400 mg/día; Progeffik®); Effik Laboratories, Madrid, Spain).

FIV

Después de la captación ovocitaria, los complejos cúmulo-corona-ovocito (CCO) se pusieron en gotas de 50 μ l de IVF (Medicult) cubiertas con aceite mineral se incubaron en un incubador a 37 °C y 6 % de CO₂. El protocolo de FIV usado ya fue descrito previamente por Pellicer y col. (13).

Para realizar la ICSI, se eliminó el cúmulo mediante exposición del CCO con hialuronidasa (80 UI/ml) un minuto como máximo. Para eliminar completamente la corona radiada, los ovocitos se aspiraron usando pipetas Pasteur de diferentes diámetros hasta que no quedaron células adheridas a la zona pelúcida. Los ovocitos se lavaron en gotas de 50 μ l de IVF (Medicult), y sólo los metafase II se inyectaron. La microinyección se realizó como ya describió Gil-Salóm y col. (14).

La evaluación de la fecundación se llevó a cabo a

las 17-20 h post-inseminación. El desarrollo embrionario se evaluó a las 41-44 y 65-68 horas post inseminación o inyección. La transferencia embrionaria se realizó a 48 ó 72 horas de la inseminación o inyección.

Gestación

La gestación se confirmó detectando niveles de β -HCG > 10 IU/ml, doce días después de la transferencia embrionaria. La gestación clínica se confirmó con la presencia de saco gestacional mediante ecografía vaginal en la semana 5 de gestación.

Evaluación estadística

Para la comparación estadística entre grupos se utilizaron X² y t-student. La significación estadística se definió cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Ambos grupos son comparables en términos de edad, niveles basales de FSH, número de ovocitos recuperados y expansión del cúmulo en los CCO. Los datos muestran que la ICSI proporciona similares tasas de fecundación (66.0% vs. 62.4%) que la FIV convencional. La calidad embrionaria en día 2 y 3, es comparable tanto en número de blastómeras como en porcentaje de fragmentación. No hay diferencias significativas en las tasas de gestación ni de implantación.

Las únicas diferencias encontradas entre grupos fueron en la tasa de cancelación y en la tasa de fallo de fecundación. La tasa de cancelación es significativamente mayor en el grupo de la ICSI (41.3%) comparado con la FIV convencional (19.2%). También el fallo de fecundación es significativamente mayor en ICSI (17.8% vs. 3.9%). Cuando se lleva a cabo una ICSI en estas pacientes, se observa una tendencia hacia un aumento en el porcentaje de transferencias de embriones canceladas aunque las diferencias no son significativas. Ver tabla 1.

DISCUSIÓN

Una baja respondedora puede definirse como alguien que responde pobremente a la estimulación ovárica, debido a una reserva ovárica disminuida y/o a una edad maternal avanzada. No todas las pacientes añosas son bajas respondedoras, ni todas las pacientes

Tabla 1
a y b son diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

	FIV	ICSI	P valor
Ciclos	78	46	-
Edad (años)	40.5	40.8	0.369
Niveles basales de FSH (IU / ml)	8.9	8.3	0.448
Transfers	63	27	-
Tasa de cancelación (%)	19.2 a	41.3 a	0.001
Fallo de fecundación (%)	3.9 b	17.8 b	0.003
Cancelación por mala calidad embrionaria (%)	15.3	23.5	0.154
Complejos cúmulo-corona-ovocito (Grado 1,2 o 3)	2.3	2.3	1.000
Ovocitos obtenidos	3.2	3.0	0.856
Tasa de fecundación (%)	62.4	66.0	0.659
Nº blastómeras en día 2	4.0	3.9	0.474
Grado de fragmentación en día 2 (%)	13.1	9.3	0.551
Nº blastómeras en día 3	7.1	6.9	0.347
Grado de fragmentación en día 3 (%)	10.3	12.9	0.689
Media de embriones transferidos	1.8	1.7	0.489
Nº blastómeras en los embriones transferidos	4.3	4.7	0.088
Grado de fragmentación en embriones transferidos (%)	13.6	10.6	0.022
Tasa de gestación/transfer (%)	30.2	33.3	0.761
Tasa de gestación/ciclo (%)	24.4	19.5	0.564
Tasa de aborto (%)	37.5	25.0	0.093
Tasa de implantación (%)	16.8	21.7	0.475

jóvenes responden normalmente a la estimulación ovárica. Algunos autores están de acuerdo en que, independientemente de la edad, las mujeres con elevados niveles de FSH en el día 3 del ciclo responden poco a la estimulación ovárica, y tienen bajas tasas de embarazo e implantación (15-19). Por otra parte, estudios recientes demuestran que la edad materna es más importante que los niveles de FSH en día 3 para predecir el éxito en reproducción asistida, mientras que pacientes jóvenes parecen preservar una elevada tasa de gestación a pesar del bajo número de ovocitos recuperados (20-22).

Independientemente de la respuesta ovárica a la estimulación, es bien conocido que la fertilidad femenina disminuye conforme aumenta la edad (23-24). Aunque las bajas tasas de gestación observadas en pacientes añosas sometidas a TRA pueden atribuirse a una disminución de la receptividad endometrial (25), la mayoría de los autores están de acuerdo en que la causa principal es la pobre calidad ovocitaria más aún que el número de ovocitos (26). Los ovarios de pacientes añosas tienden a responder pobremente cuando se compara con los de mujeres jóvenes, produciendo ovocitos de baja calidad y reduciendo por tanto las tasas de fecundación (27). Defectos del citoesqueleto (28), estrés oxidativo (29), disfunciones

mitocondriales (30), apoptosis (31) y un elevado nivel de degeneración (causado por anomalías cromosómicas) están asociados con la senescencia ovocitaria (32).

Hay una tendencia social de posponer la maternidad hasta los treinta y tantos años cuando no hasta los cuarenta. Muchas de esas mujeres son bajas respondedoras, y elegir la técnica de fecundación adecuada es crucial especialmente en este grupo de pacientes. El presente estudio se diseñó para comparar ambas técnicas -FIV vs. ICSI-, y así optimizar el resultado de los ciclos con bajo número de ovocitos. Como se vio en el estudio de Moreno y colaboradores (33), se obtienen similares tasas de gestación e implantación con ambas técnicas. Sin embargo, se observó una tasa de cancelación significativamente mayor cuando se hizo ICSI (41.3%) que cuando se hizo FIV convencional (19.3%). Esto puede ser debido a la combinación de una mala calidad ovocitaria y el impacto de la técnica de fecundación en ellos. Se sabe que la degeneración de los ovocitos es a veces inevitable cuando se realiza un ICSI debido a problemas técnicos o a las características propias del oolema. La ICSI es un procedimiento delicado que puede dañar estructuras citoplasmáticas en el ovocito, causando un detrimento en el desarrollo embrionario (34) si no se hace adecua-

damente. Ebner y colaboradores (35) han descrito las diferentes dificultades que una persona puede encontrar cuando realiza una microinyección, y concluyen que las anomalías cromosómicas de la zona pelúcida y del oolema, junto a ciertos problemas técnicos, afectan negativamente a la supervivencia del ovocito después de la ICSI. Los ovocitos de mala calidad, que aparecen más frecuentemente en mujeres arias, pueden ser más sensibles al daño celular. Esto puede explicar la elevada tasa de cancelación, las bajas tasas de fecundación y gestación, así como el incremento significativo de la tasa de fallo de fecundación en nuestras pacientes de ICSI (17.8%) cuando se comparan con las de FIV convencional (3.9%), en nuestro grupo de estudio.

Aunque hay estudios en la literatura que no muestran diferencias ni en tasas de gestación ni de implantación con FIV e ICSI (36-37), no mencionan grupos de pacientes que tienen bajo número de ovocitos recuperados en punción. El oolema puede responder de forma diferente a la penetración de la pipeta durante la microinyección, especialmente si son ovocitos de mala calidad de mujeres arias. Palermo y colaboradores (38) describen 3 tipos diferentes de respuesta: ruptura normal, ruptura rápida, y ruptura dificultosa. Ellos concluyeron que los ovocitos que experimentan una ruptura rápida tienen baja supervivencia y tasa de fecundación cuando se compara con los otros grupos; interesantemente observaron que las pacientes que tenían este tipo de ovocitos tenían estimulaciones significativamente más cortas y menores concentraciones de estradiol sérico. No es posible saber si los ovocitos que experimentan una ruptura rápida se fecundarían con una FIV convencional, pero es esperable que este tipo de ovocitos tengan una mayor tasa de supervivencia con FIV que con ICSI (y por tanto una mayor tasa de fecundación), ya que el procedimiento es menos invasivo y traumático.

Diversos estudios (39-42) han obtenido mayores tasas de supervivencia ovocitaria, haciendo microagujeros con láser en la zona pelúcida creando un "canal" a través del cual pasar la aguja de inyección y penetrar en el oolema de la manera menos traumática. Rienzi y colaboradores (43) emplearon esta técnica por primera vez en ovocitos humanos en una pareja con 4 fallos previos de ICSI por una mala calidad ovocitaria debida a una fragilidad de los ovocitos. Cinco ovocitos fecundaron correctamente y la pareja consiguió un embarazo. Ellos indican que la ICSI asistida por láser da como resultado una baja tasa de degeneración y un mayor desarrollo embrionario, sugiriendo que se minimiza el trauma causado por esta técnica y así el resultado del ciclo puede ser

mejorado. Estos resultados apoyan nuestra principal hipótesis, en la que la FIV convencional (dado que es menos invasiva que la ICSI) puede beneficiar a parejas con edad maternal avanzada y una baja reserva ovárica.

Sabemos que la ICSI ha revolucionado la Reproducción Asistida, de hecho hay algunos autores que apoyan el uso de la ICSI para todas las indicaciones (44). Sin embargo, nosotros sugerimos, basándonos en nuestros resultados, que en pacientes con baja respuesta, con parámetros seminales normales y sin ciclos previos de fallo de fecundación con FIV, la FIV convencional sería la técnica de elección ya que reduce los posibles problemas técnicos que pueden tener lugar durante la ICSI, y también reduce el riesgo de dañar a los ovocitos de mala calidad que son más frágiles o tienen una ZP más resistente. Además obtenemos tasas similares de gestación e implantación, y se reducen las tasas de cancelación y de fallo de fecundación, optimizando el resultado del ciclo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Droesch K, Muasher SJ, Brzyski RG, Jones GS, Simonetti S, Liu HC et al.:** Value of suppression with a gonadotropin-releasing hormone agonist prior to gonadotropin stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1989; 51:292-7.
2. **Seifer DB, Scott RT Jr, Bergh PA, Abrogast LK, Friedman CI, Mack CK et al.:** Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in day 3 follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 1999; 72:63-65.
3. **Bancsi L F J M M, Broekmans FJM, Looman C W N, Habbema J D F, te Velde E R.:** Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 81:35-41.
4. **García JE, Jones GS, Acosta AA, Wright G Jr.:** Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase I, 1981. *Fertil Steril* 1983; 39:167-173.
5. **Pellicer A, Lightman A and Diamond MP.:** Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation. *Fertil Steril* 1987; 65:899-908.
6. **Keay SD, Lenton EA, Cooke ID, Hull MGR, Jenkins JM.:** Low-dose dexamethasone augments the ovarian response to exogenous gonadotrophins leading to a reduction in cycle cancellation rate in a standard IVF programme. *Hum Reprod* 2001; 16:1861-1865.
7. **Templeton A, Morris JK, Parslow W.:** Factors that

- affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet* 1996; 348:1402-1406.
8. **Jenkins JM, Davies DW, Devonport H, Anthony FW, Gadd SC, Watson RH et al.:** Comparison of 'poor' responders with 'good' responders using a standard buserelin/human menopausal gonadotrophin regime for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1991; 6:918-921.
 9. **Van Rooij IA, Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, Te Velde ER.:** Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003; 79:482-488.
 10. **Jiao Z, Zhuang G, Zhou C, Xu Y, Liang X, Li L et al.:** Influence of advanced age on the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2002; 37:223-226.
 11. **Ron-El R, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Kasterstein E, Friedler S.:** Outcome of assisted reproductive technology in women over the age of 41. *Fertil Steril* 2000; 74:471-475.
 12. **Garcia-Velasco JA, Moreno L, Pacheco A, Guillen A, Duque L, Requena A, Pellicer A.:** The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intra-ovarian androgens and improves in vitro fertilization outcome in low responder patients: a pilot study. *Fertil Steril* 2005; 84:82-7.
 13. **Pellicer A, Simón C, Miró F et al.:** Ovarian response and outcome of in-vitro fertilization in patients treated with gonadotrophin-releasing hormone analogues in different phases of the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1989; 4:285-289.
 14. **Gil-Salom M, Mínguez Y, Rubio C et al.:** Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1995; 10:3166-3170.
 15. **Scott RT, Toner JP, Muasher SJ et al.:** Follicle stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1989; 51:651-654.
 16. **Pearlstone AC, Fournet N, Gambone JC et al.:** Ovulation induction in women age 40 and older: the importance of basal follicle stimulating hormone level and chronological age. *Fertil Steril* 1992; 58:674-679.
 17. **Evers JLH, Slaats P, Land JA et al.:** Elevated levels of basal estradiol-17 β predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998; 69:1010-1014.
 18. **Sharif K, Elgendy M, Lashen H and Afnan M.:** Age and basal follicle stimulating hormone as predictors of in vitro fertilization outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105:107-112.
 19. **El-Toukhy T, Khalaf Y, Hart R, Taylor A, Braude P.:** Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve-an eight year study. *Hum Reprod* 2002; 17:1519-1524.
 20. **Abdalla H, Thum MY.:** An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod* 2004; 19:893-8.
 21. **Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS.:** Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003; 79:63-8.
 22. **Galey-Fontaine J, Cedrin-Durnerin Chaibi Massin N, Hugues JN.:** Age and ovarian reserve are distinct predictive factors of cycle outcome in low responders. *Reprod Biomed Online* 2005; 10:94-9.
 23. **Stovall DW, Toma SK, Hammond MG et al.:** The effect of age on female fecundity. *J Obstet Gynecol* 1991; 77:33-36.
 24. **Pellicer A, Simón C, Remohí J.:** Effects of aging on the female reproductive system. *Hum Reprod* 1995; 10:77-83.
 25. **Yaron Y, Botchan A, Amit A et al.:** Endometrial receptivity: the age-related decline in pregnancy rates and the effect of ovarian function. *Fertil Steril* 1993; 60:314-318.
 26. **Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garisi GJ, Guzman I, Sandler B et al.:** Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* 1991; 337:1375-1377.
 27. **Liu L, Keefe DL.:** Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 2000; 62:1828-34.
 28. **Hewitson L, Simerly C, Schatten G.:** Cytoskeletal aspects of assisted fertilization. *Semin Reprod Med* 2000; 18:151-9.
 29. **Arici A, Behrman H, Keefe DL.:** The role of prostanoids and oxygen radicals in reproduction. In: S Yen, R Jaffee, R Barbieri (eds.), *Reprod Endoc*, 3rd ed. Philadelphia: Harcourt Brace Jovanovich Inc 1999; 238-272.
 30. **Jansen RP, Burton GJ.:** Mitochondrial dysfunction in reproduction. *Mitochondrion*. 2004; 4:577-600.
 31. **Bosco L, Ruvolo G, Morici G, Manno M, Cittadini E, Roccheri MC.:** Apoptosis in human unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2005; 84:1417-23.
 32. **Lim AS, Tsakok MF.:** Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes? *Fertil Steril* 1997; 68:265-71.
 33. **Moreno C, Ruiz A, Simón C, Pellicer A, Remohí J.:** Intracytoplasmic sperm injection as a routine indication in low responder patients. *Hum Reprod* 1998; 13:2126-2129.

34. **Dumoulin JM, Coonen E, Bras M, Bergers-Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen RC, Van Wissen LC et al.:** Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. *Hum Reprod* 2001; 16:306-12.
35. **Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Jesacher K, Tews G.:** A prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of injection technique and morphological features. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:12.
36. **Staessen C, Camus M, Clasen K, De Vos A and Van Steirteghem A.:** Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Hum Reprod* 1999; 14: 2474-2479.
37. **Rumste MME, Evers JLH, Farquhar CM.:** 2004 ICSI versus conventional techniques for oocytes insemination during IVF in patients with non-male factor subfertility: a Cochrane review. *Hum Reprod* 19: 223-227.
38. **Palermo GD, Alikani M, Bertoli M, Colombero LT, Moy F, Cohen J et al.:** Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11:172-176.
39. **Abdelmassih S, Cardoso J, Abdelmassih V, Dias JA, Abdelmassih R, Nagy ZP.:** Laser-assisted ICSI: a novel approach to obtain higher oocyte survival and embryo quality rates. *Hum Reprod* 2002; 17:2694-2699.
40. **Nagy ZP, Oliveira SA, Abdelmassih V, Abdelmassih R.:** Novel use of laser to assist ICSI for patients with fragile oocytes: a case report. *Reprod Biomed Online* 2002; 4:27-31.
41. **Eroglu A, Nahum RT, Isaacson K, Toth TL.:** Laser-assisted intracytoplasmic sperm injection in human oocytes. *J Reprod Med* 2002; 47:199-203.
42. **Moser M, Ebner T, Sommergruber M, Gaisswinkler U, Jesacher K, Puchner M et al.:** Laser-assisted zona pellucida thinning prior to routine ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19:573-8.
43. **Rienzi L, Greco E, Ubaldi F, Iacobelli M, Martinez F, Tesarik J.:** Laser-assisted intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001; 78:179-182.
44. **Abu-Hassan D, Al-Hasani S.:** The use of ICSI for all cases of in-vitro conception. *Hum Reprod* 2003; 18:893-894.