

## Factores que influyen en los fallos de Fecundación In vitro

### *Factors affecting in Vitro Fertilization failures*

Núñez Calonge R, García Enguíanos A, Cortés Gallego S, Sarrias Ramírez O, Caballero Peregrín P.

Clínica Tambre. Madrid. España

#### **Resumen**

*La baja tasa de gestaciones conseguida con un ciclo de Fecundación in vitro, conduce a la realización de varios ciclos repetidos en parejas en las que ha fallado previamente. Por eso, podría ser de utilidad conocer la posibilidad de gestación en ciclos subsiguientes. En este tema se revisarán las distintas opiniones que existen en la literatura sobre el número de ciclos de Fecundación in vitro que deben realizarse, así como se analizan los factores que pueden intervenir en el fracaso para conseguir una gestación. Entre estos factores se encuentran: inducción de la ovulación, edad de la mujer, endometriosis, calidad ovocitaria, causas genéticas, factor masculino, calidad embrionaria, laboratorio de embriología y transferencia embrionaria. Así mismo, se considera el papel de la microinyección espermática tras un fracaso de fecundación in vitro convencional.*

**Palabras clave:** Fecundación in vitro. Microinyección espermática. Ovocito. Espermatozoides. Calidad embrionaria. Implantación.

#### **Summary**

*The low rate of ongoing pregnancies in IVF cycles leads to a high number of repeated cycles in couples with previously failed attempts. Therefore it would be helpful to have a prediction about the chance of becoming pregnant in a repeated cycle. The aim of this study was to analyse the different aspects that provide a more realistic assessment of overall success rates after multiple treatment cycles. Factors that are known to influence the pregnancy rate, such as stimulation protocol, woman age, oocyte quality, genetic disturbances, male factor, quality of embryos, embryology laboratory and embryo transfer methodology, were studied. On the other hand, we evaluate the intracytoplasmic sperm injection as a treatment after a failure of the in vitro fertilization cycle.*

**Key words:** In Vitro fertilization. Intracytoplasmic sperm injection. Oocyte. Sperm. Embryo quality. Implantation.

---

Recibido: 21/5/2001

Aceptado: 12/6/2001

**Correspondencia:** Dr. R. Núñez Calonge

Clínica TAMBRE

calle Tambre nº 8

28002 Madrid

## INTRODUCCIÓN

Aproximadamente entre un 10-15% de las parejas sufren problemas de infertilidad. Con las actuales técnicas de Reproducción Asistida, muchas de ellas inician un programa de Fecundación in vitro (FIV) y transferencia embrionaria (TE) con la esperanza de lograr una gestación. Con un diagnóstico correcto lo más lógico sería esperar que se solucione el problema y se consiga un embarazo, al menos con una probabilidad cercana a la que ofrece un ciclo natural. No obstante, y por diversos motivos, algunas parejas no alcanzan este objetivo. La tasa de embarazo clínico medio por ciclo de FIV oscila desde el 26% (European IVF Monitoring Programme TT, ESRHE) (1), al 44,8% del grupo de Palermo (2). En nuestra experiencia, la tasa de gestación clínica por ciclo de FIV-ICSI es del 30% (3). Sin embargo, la práctica totalidad de los embarazos tiene lugar en los primeros cuatro ciclos. El fallo repetido para la consecución del embarazo en ciclos consecutivos de FIV es frustrante, y el número de intentos que deben realizarse es un tema aún controvertido.

Antes de todo, es necesario dejar muy claro lo que significa un fallo de FIV. Cuando hablamos de fallo de FIV, podemos referirnos al fallo de fecundación en un ciclo convencional de Fecundación in vitro. Sin embargo, este problema puede solucionarse actualmente con la microinyección intracitoplasmática (ICSI), e igualmente también son subsidiarios casos de factor masculino muy severo, con los que se obtienen tasas de fecundación similares a las de varones sin patología (4). Por lo tanto, ¿cuándo referirnos a fallo de FIV? ¿cuándo falla la microinyección de forma inexplicable? ¿cuándo no hay fecundación, no se produce división o cuándo se origina un fracaso de implantación? Creemos que es mucho más sencillo tratar el fallo de FIV como un fallo de gestación, bien utilizando tanto FIV convencional como ICSI.

Existen numerosos factores conocidos que influyen negativamente en la consecución de un embarazo por FIV. Uno de los principales es la edad de la mujer, pero también intervienen otros como el factor masculino muy severo, respuesta ovárica a la inducción, etiología de la infertilidad, e incluso control de calidad y equipo del laboratorio de Fecundación in vitro. En este tema se revisarán brevemente las distintas opiniones de algunos grupos que trabajan en Reproducción Asistida sobre el número máximo de ciclos que se aconseja, así como se analizarán las causas que pueden originar un fallo de FIV.

## NÚMERO DE INTENTOS DE FIV

Desde hace años se está intentando conocer cual debe ser el límite que hay que plantear a una pareja para dejar de intentar la gestación en FIV, sin llegar a un consenso sobre la respuesta. Ya en 1989, Padilla y García (5), del grupo de Baltimore, informaron de una tasa de gestación estable de los ciclos terceros a séptimo (23%), y por ello aconsejaron continuar durante este tiempo los intentos. La tasa acumulativa de embarazos para los ciclos 3, 5 y 7 fue de 62, 83 y 93% respectivamente.

En 1994, Guzick y cols (6), publicaron un trabajo en el que presentaban un modelo para comprobar la eficacia del tratamiento de Reproducción Asistida. Así, informaron de una probabilidad de embarazo clínico por ciclo del 14,8%, esencialmente constante en la medida que se repetían los ciclos. La predicción de embarazo clínico acumulativo en el tercero, sexto, noveno y doce ciclo se vio que era del 37%, 60%, 75% y 84% respectivamente.

Actualmente, continúa la controversia, y cada grupo opina dependiendo de su experiencia. En un artículo publicado por el grupo de Engmann y cols (7) en 1999, se informa de una mayor probabilidad de gestación con 3 ciclos de FIV. En este trabajo se analiza la posibilidad de gestación en un primer intento, o bien ofreciendo a la paciente poder realizarse tres ciclos dentro del mismo año. Se divide a las pacientes en dos grupos de edad: mayores y menores de 40 años, obteniéndose los siguientes resultados: la probabilidad acumulada de conseguir un embarazo clínico después de dos ciclos de tratamiento fue del 38,2% y 33% en ambos grupos de edad, frente a un 54% y 48% en los mismos grupos, después de tres ciclos de tratamiento.

En el mismo año, el grupo de De Vries realiza un estudio que estudia la tasa de embarazo acumulativo utilizando tablas de la vida, considerando igualmente que son necesarios al menos tres ciclos de FIV (8). A la misma conclusión llega el grupo de Fukuda en un estudio más reciente de este año (9).

## CAUSAS QUE PUEDEN ORIGINAR FALLOS DE FIV

### 1. - Inducción de la ovulación

Hasta la fecha, han sido numerosos los protocolos de control de la ovulación que se han utilizado en FIV, con resultados dispares. Estos incluyen citrato de clomifeno, hormona gonadotropina menopáusica

urinaria humana (hMG), sola o con hormona folículo estimulante urinaria humana (FSH u ), ultrapura (FSH p) o recombinante (FSHr). También se han realizado muchos estudios en los cuales se comparan tasas de gestación en función del protocolo empleado, pero hoy en día la mayoría de los grupos emplean la FSH, combinada o no con hMG. Mercan y cols (10), compararon las tasas de gestación en ciclos de FIV empleando FSH sola frente a FSH + hMG. Los resultados demostraron mayor porcentaje de embarazos en el primer grupo (40%), frente al segundo (28%). Sin embargo, Sills y cols (11) no obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la respuesta folicular, niveles séricos de estradiol y calidad embrionaria comparando estos dos protocolos de inducción. Estos mismos resultados los obtuvieron Crain y col (12) en el mismo año, empleando FSH en un grupo y hMG sola en otro. Jacob y cols (13) utilizaron FSH recombinante frente a hMG, consiguiendo un 14% de gestaciones en el primer grupo frente a un 20% en el segundo.

En un trabajo realizado por Weissman y cols (14) en 1999 se comparan los resultados de ICSI después de la estimulación con FSH comparando con hMG. Se demuestra que en pacientes normogonadotropas, la terapia con FSH ultrapura es tan efectiva como la estimulación con hMG, así como la sincronización del crecimiento y maduración folicular y las tasas de gestación, por lo que concluyen que no es necesario el aporte de hormona luteinizante (LH) en el protocolo de estimulación.

En general, a pesar de los distintos resultados ofrecidos en diferentes pautas, un juicio crítico de cada uno de los estudios no demuestra la superioridad de un tratamiento sobre otro. Más demostrativo es el trabajo de Agrawal del año 2000 (15) que realiza un meta-análisis para analizar los resultados de FIV utilizando FSH sola o con hMG, teniendo en cuenta los diferentes protocolos de administración de análogos de la GnRH. Estos autores concluyen que, tanto en el protocolo largo como en el corto con agonistas de la GnRH, no hay diferencias en la tasa de gestación por ciclo al utilizar FSH sola o combinada con hMG. Sin embargo, en los protocolos donde no se utilizaron análogos, la FSH sola demostró ser más eficaz.

La decisión, en fin, de si a la FSH urinaria o recombinante se le añade hMG, podría venir marcada por el nivel de LH en el suero sanguíneo el día del control y comienzo del desarrollo folicular múltiple (DFM). De esta manera, niveles de LH inferiores a 1,5 mUI/ml, serían susceptibles de añadir hMG a FSH, y con niveles superiores a esta cifra, se podría iniciar el DFM únicamente con FSH. (16)

En los últimos años, con la aparición de la FSH

recombinante, se ha discutido mucho sobre su superioridad frente a la FSH pura. Es interesante el reciente trabajo de Schats y cols (17), que aunque demuestran la efectividad de la estimulación en FIV utilizando FSH pura en el protocolo largo con agonistas de la GnRH, comprueban sin embargo que es más efectiva la FSH recombinante para inducir el desarrollo folicular múltiple.

Acerca del empleo de análogos de la GnRH como supresores hipofisarios, también se han publicado varios trabajos que demuestran la influencia de unos u otros en los resultados de FIV. Así, Simberg y col (98) (18) comparan la buserelina y nafarelina en cuanto al número de ovocitos, fertilización y tasas de implantación, así como el número de embarazos. Se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de ovocitos recuperados (más con buserelina), pero sin embargo mayor número de gestaciones y tasa de implantación con nafarelina. Los autores apuntan que el tratamiento de estas sustancias podrían afectar la calidad embrionaria.

Respecto a la relación entre la respuesta ovárica-protocolos de inducción y resultados de fecundación in vitro, la hiperestimulación ovárica es una de las causas principales de los fallos de FIV. Esta ampliamente demostrado en la literatura (19), que el desarrollo multifolicular con niveles séricos de estradiol muy elevados, origina que los ovocitos desarrollados sean de inferior calidad, y en la mayoría de los casos se compromete la fecundación y/o el desarrollo embrionario. Cuando existe una respuesta excesiva a la estimulación ovárica se puede aplicar el coasting. Este método requiere interrumpir la administración de gonadotropinas mientras se continúa utilizando los análogos de la GnRH. En la literatura se muestran tasas de embarazo aceptables, entre un 26 y un 64% (20), aunque con una gran dispersión entre los grupos. Nuestra experiencia con el coasting se reduce únicamente a 12 casos, en los que se lograron 2 gestaciones (16%). En nuestra opinión, y en relación con la gran disparidad de resultados obtenidos, pensamos que el solo hecho de tener que utilizar el coasting es suficiente para justificar un descenso en la tasa de gestación. El coasting parece no comprometer la calidad ovocitaria, aunque no se elimina definitivamente el riesgo de hiperestimulación ovárica.(20).

Una de las cuestiones más controvertidas respecto al régimen de estimulación ovárica se refiere a la consecución de una respuesta hormonal y folicular óptimas, relacionándose con una fase lútea adecuada. La discrepancia existente entre las tasas de fecundación y las de gestación, sugieren que la superovulación puede afectar de manera adversa la receptividad

endometrial y el medio ambiente hormonal en la fase lútea. Los efectos de los tratamientos de inducción de la ovulación en la fase lútea, han sido analizados por muchos autores, obteniéndose igualmente resultados dispares (21, 22). En cualquier caso, la superovulación y aspiración de ovocitos, crea un espectro de alteraciones hormonales con efectos muchas veces críticos para la implantación y mantenimiento del embarazo. Los intentos para optimizar los resultados, cambiando el medio hormonal ya alterado (por ejemplo, con la suplementación de la fase lútea empleando progesterona o bien gonadotropina coriónica humana (hCG), conducen a un intento de sincronización entre el ovario y el endometrio, para poder obtener ovocitos y embriones de buena calidad, y después un adecuado medio endometrial que asegure la gestación.

Basir y col (23), en un trabajo muy reciente investigaron como las altas concentraciones de estradiol tras la estimulación ovárica en mujeres infértiles, afectan el desarrollo endometrial en el momento de la implantación. Para ello, realizaron biopsias de endometrio en el día 7 (+/- 1) después de la hCG. El efecto de las concentraciones muy altas de estradiol podrían ser explicadas por la evaluación cuantitativa de las biopsias endometriales como una desincronía estroma-glandular, lo cual indica una deficiente transformación secretora del endometrio, que a su vez representa un medio ambiente endometrial subóptimo para la implantación.

A pesar de la gran cantidad de literatura publicada al respecto, no existe un consenso respecto a cual es la mejor terapia a utilizar (24, 25, 26). Además, sería necesario realizar un estudio grande, prospectivo y multicéntrico para que las investigaciones en este campo ayuden a clarificar todas estas cuestiones.

## **2.-Edad de la mujer**

La fertilidad en la mujer se sabe que declina a partir de los 30 años, y más acusadamente a partir de los 35. El pico de fertilidad se halla a los 25 años, bajando a lo largo de la vida reproductiva (27). Esta bajada se debe a factores como: deplección folicular progresiva, disminución de la función de las células de la granulosa, disminución de la calidad ovocitaria, aumento de las anomalías cromosómicas, disminución de la receptividad endometrial, aumento de la tasa de abortos, y aumento de la morbilidad perinatal (28, 29). Igualmente, las tasas de gestación en FIV disminuyen con la edad, debido al menor número de ovocitos, menor calidad de los mismos, y más baja tasa de implantación por embrión. Existe una calidad embrionaria disminuida, tal vez por alteraciones cromosómicas,

que se asocia con una mayor tasa de abortos (30, 31). En un estudio de Sharif y col en 1998 (32) examinaron el efecto de la concentración de FSH en el 3º día del ciclo y la edad de la mujer en la respuesta ovárica tras inducción con gonadotropinas, tasa de fecundación y de embarazo en un programa de FIV. Los resultados demostraron que el incremento en la concentración de FSH por encima de 12 mUI/ml estaba significativamente asociado con un aumento en la tasa de cancelación y el número de ovocitos recuperados, mientras que la edad se asociaba negativamente con la tasa de embarazo.

Como conclusión, podemos decir, que cualquier grupo de Reproducción Asistida en la actualidad, tiene en cuenta la edad de la mujer, sobre todo a partir de los 40 años, como factor pronóstico principal asociado a fallo de FIV. En nuestra experiencia, la tasa de gestación por ciclo de FIV baja de un 36% entre 30 y 35 años a un 30% entre 36 y 39 y un 23% con 40 o más años de edad. Por el contrario, la tasa de abortos aumenta de un 11, 27 y 33% en los mismos grupos de edad. (3)

## **3. - Endometriosis**

La endometriosis es una patología que incide sobre la fertilidad de forma tan importante, que tiene entidad por sí sola. La relación causa-efecto entre endometriosis e infertilidad, aunque tradicionalmente aceptada, es difícil de probar debido a la multitud de mecanismos por medio de los cuales la endometriosis puede interferir con la fertilidad. Aunque los tratamientos tanto quirúrgico como hormonal mejoran, no restauran completamente la fertilidad en la mayoría de los casos. Por eso una de las principales indicaciones de Fecundación in vitro es la endometriosis, sobre todo en estados avanzados de la enfermedad. Varios estudios han comprobado que se obtienen menores tasas de fecundación y menores tasas de implantación, debido por una parte a la peor calidad ovocitaria y embrionaria, así como factores endometriales (que dependen del estadio de endometriosis) (33, 34). No está aún muy claro cual es el mecanismo que desencadena estos efectos adversos. Algunos estudios implican como causa principal la existencia de autoanticuerpos anómalos, sobre todo del grupo de los antifosfolípidos que se ha encontrado en el 60% de las mujeres con endometriosis (35, 36). Esta pudiera ser la causa de las bajas tasas de fecundación, pobre desarrollo embrionario y bajo índice de implantación y embarazo. Otros trabajos refieren que las pacientes con endometriosis poseen mayor porcentaje de ovocitos inmaduros en relación al porcentaje total

de folículos (37). Estos mismos autores relacionan la incidencia de cuerpos apoptóticos en la membrana de la granulosa con el desarrollo folicular y calidad ovocitaria.

#### 4. - Calidad ovocitaria

La calidad ovocitaria es otro de los factores relacionados con el éxito de la fecundación in vitro. El término calidad, se refiere sobre todo a la morfología, ya que en todos los casos nos referimos a ovocitos maduros o metafase II. La morfología alterada conlleva en ocasiones, la existencia de anomalías citoplásmicas, zona pelúcida oscura, espacio perivitelino aumentado, citoplasma granular, ovocitos con anomalías de forma, vacuolas, etc (38).

A veces, la calidad ovocitaria es un factor desconocido hasta que se observan los gametos tras un ciclo de FIV. No es difícil encontrarlos con casos en los que se ha realizado un ciclo de FIV tras sucesivos intentos fallidos de inseminación intrauterina, en parejas diagnosticadas como de infertilidad idiopática, y comprobar que la causa de la esterilidad es la mala calidad de los ovocitos obtenidos. Y aunque en general existe un consenso sobre la importancia de la calidad ovocitaria como responsable de los resultados de FIV, en la literatura existen trabajos contradictorios.

Balaban y col (39) realizaron un estudio en el que comparan tasas de fecundación, división y embarazo en dos grupos de pacientes: ovocitos normales, y con alguna de las alteraciones mencionadas anteriormente. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos para los parámetros estudiados. Un año antes, no obstante, el grupo de Serhal y col (40), comprobó que existían tasas similares de fecundación y desarrollo embrionario con ovocitos normales y con morfología anormal, pero estos últimos embriones conseguían menores tasas de implantación y embarazo. Mansour y col (41), en 1998 con un estudio equivalente, obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de fecundación y división embrionarias.

Saito y cols (42) opinan que es necesario un ovocito de buena calidad para el desarrollo de un embrión también de buena calidad. Reafirmando esta hipótesis, Suppinyopong y cols (43) realizaron un estudio en el cual determinaron si la morfología del ovocito se correlacionaba con los resultados de microinyección espermática. Los resultados obtenidos demostraron que la morfología ovocitaria se correlaciona con la morfología embrionaria después del ICSI.

La calidad ovocitaria, sin embargo, es un concepto en ocasiones bastante subjetivo, y no todos los grupos tienen estandarizados los protocolos de clasificación

de ovocitos anómalos. Sería necesario realizar un estudio a gran escala, randomizado y en el que se separasen los casos de anomalías ovocitarias del resto de patologías (masculina, endometriosis, baja respuesta, edad, etc.), para comprobar realmente cuales son los resultados en función solamente de los gametos femeninos.

Últimamente, también se han tenido en cuenta otros factores a la hora de clasificar los ovocitos. Un trabajo de Ebner y col (44) estudia el valor pronóstico de la morfología del primer corpúsculo polar en la tasa de fecundación y calidad embrionaria en ICSI. Los resultados demostraron que la morfología del primer corpúsculo polar revela una correlación significativa con la tasa de fecundación ( $p < 0,025$ ) y la calidad embrionaria ( $p < 0,001$ ). En otro trabajo del grupo de Wittemer (45) se demuestra la relación entre la distribución y morfología de los pronúcleos de los cigotos con la calidad embrionaria.

Por otra parte, la cuestión que habría que dilucidar es cual es el origen de la mala calidad ovocitaria (edad, genéticas, endometriosis, hiperestimulación, etc.), porque es lógico pensar que un ovocito anómalo puede ser la causa tanto de fallos de fecundación como de mala división embrionaria y por lo tanto de fallo de gestación.

En un trabajo publicado por Nasser y Grifo en 1998 (46), se comentan las principales barreras para el éxito en Reproducción Asistida, que es tanto como decir cuales son las causas que influyen en los fallos de FIV. Los autores refieren que el diagnóstico clínico es el principal desafío para conseguir el éxito en Reproducción Asistida. La calidad de los gametos está relacionada de forma directamente proporcional al éxito en fecundación in vitro, pero primero hay que conocer el origen de la inadecuada calidad de los mismos.

Cuando la calidad ovocitaria no está relacionada con anomalías en su morfología, es más difícil detectar la relación entre fallo de fecundación y alteraciones del gameto femenino. La dificultad en la formación del pronúcleo o la no disrupción del segundo corpúsculo polar, son el origen de defectos intrínsecos, no detectables a simple vista, pero que puede ser el origen de fallos de fecundación tanto en FIV como en ICSI (47).

#### 5. - Causas genéticas

Las recientes técnicas de diagnóstico preimplantatorio e hibridación in situ (FISH), tanto en gametos como en embriones, han demostrado el origen genético de determinados casos de fallos de FIV. El diagnós-

tico genético preimplantatorio puede identificar determinados errores genéticos responsables de los fallos de implantación (48). En otra serie de estudios se ha podido comprobar que existe una base genética para la implantación y la supervivencia embrionaria (49).

La evaluación de los cigotos por FISH en un caso de fallo de fecundación, corroboró que todos eran anómalos para los cromosomas estudiados, constatando así la causa de ausencia de división en los mismos (50).

Bedford y Kim (51) analizaron genéticamente 442 ovocitos no fertilizados de 154 ciclos en los cuales había ocurrido un fallo de fecundación in vitro. El origen del fallo de FIV se suponía que no era masculino, ya que en todos los casos se encontraron espermatozoides pegados a la zona pelúcida. Se encontraron anomalías en un 79,4% de los ovocitos.

Otro trabajo que ilustra la importancia de las aberraciones cromosómicas en los fallos de FIV es del grupo de Benkhalifa y col (52). En este estudio se analizan los cigotos no divididos tras la fecundación. El 39% de los ovocitos que poseían un corpúsculo polar fueron citogenéticamente anormales. De los que presentaban dos corpúsculos, el 21,5% eran anómalos.

El grupo de Peschka y col (53) demuestra la necesidad de un estudio genético previo a la microinyección espermática, tras el estudio de 781 parejas en las que encontraron un 13,1% de cariotipos anómalos.

## 6. - Factor masculino en los fallos de FIV

La aparición del ICSI revolucionó el concepto de infertilidad masculina. Tal es así, que se llegó a pensar en la inexistencia de varones infértiles, aún en el caso de azoospermias, ya que se consiguen embarazos con espermatozoides de testículo en los mismos porcentajes que con espermatozoides de eyaculado (54, 55, 56). El único caso en el que claramente se admitía la influencia negativa del gameto masculino en los resultados de ICSI es en las astenozoospermias totales, ya que no se han conseguido prácticamente gestaciones (57). Sin embargo, desde hace pocos años, los fallos de fecundación en ciclos de ICSI han demostrado la existencia de factores espermáticos responsables de tales resultados, y existen trabajos recientes que prueban el efecto del gameto masculino en los resultados de fecundación, división embrionaria y gestaciones en ciclos de ICSI como se revisará posteriormente. En un trabajo reciente se ha demostrado la influencia del origen espermático en la división embrionaria y consecución de blastocistos (58).

Duran et al (59) determinaron los valores predictivos del análisis de semen de rutina, morfología según criterio estricto, y estado del ADN para FIV. Estos

autores encontraron que la morfología y concentración de espermatozoides progresivos móviles eran los principales parámetros determinantes para la capacidad fertilizadora in vitro. El modelo de regresión logística compuesto por la morfología y el test de naranja de acridina, fueron los tests con mayor capacidad predictiva en FIV.

El espermatozoide que se microinyecta debe poseer una cromatina capaz de decondensarse en el momento que entra en contacto con el núcleo del ovocito. Se ha demostrado recientemente que los cambios estructurales en la cromatina pueden suceder a lo largo del tiempo de cultivo, y que está dentro de un período de 2 horas en el caso de semen congelado-descongelado(60).

Aunque, se ha comprobado que no es necesaria la maduración del espermatozoide en el epidídimo para que se complete la maduración nuclear (61), algunos grupos han demostrado que pacientes con infertilidad de origen masculino poseen anomalías ocultas en el núcleo espermático, que se traducen en un mayor nivel de empaquetamiento de la cromatina y daño del ADN (62, 63). En un estudio publicado por Bergere y col (64), se analiza la causa del fallo de división tras ICSI. Para ello, se analizaron 79 ovocitos y espermatozoides de pacientes con repetidos fallos de FIV o factor masculino severo, chequeando el grado de condensación de la cromatina nuclear espermática, y los cromosomas de los ovocitos. Se encontró que en un 89% de los casos, el núcleo masculino no estaba decondensado, y en un 45% existía rotura cromosómica del núcleo del ovocito. Más recientemente (65), se sugiere que las muestras de semen de muy mala calidad utilizadas para ICSI, tienen una mayor posibilidad de contener ADN fragmentado a pesar de la apariencia normal de los espermatozoides. Estos autores admiten que desconocen el efecto de estos hallazgos en la fecundación de ovocitos en ICSI, así como en el desarrollo embrionario. Sin embargo, existen trabajos previos que relacionan determinados fallos de fecundación en ICSI con defectos en la condensación de la cromatina (66). Sakkas y cols (67), en 1998 publicaron que el daño del ADN nuclear del espermatozoide tiene un efecto negativo, no sólo en la tasa de fecundación, sino en el desarrollo embrionario hasta blastocisto, comparándose con embriones obtenidos tras FIV convencional. En este trabajo también se relaciona la cromatina alterada con anomalías morfológicas de los espermatozoides. Larson y cols (68), más recientemente han demostrado la relación entre la estructura de la cromatina espermática y los fallos para conseguir una gestación con FIV. Por el contrario, Moilanen y cols (69) encontraron que la mala calidad

espermática influye en la tasa de fecundación tanto en FIV como en ICSI, pero no en la calidad embrionaria y en los resultados de criopreservación de los embriones.

En otros estudios se ha demostrado la existencia de un factor activador (SOAF: sperm borne oocyte activatin factor) que aparece durante la transformación de la espermátide redonda en espermatozoide y que viene a corroborar la idea de que los componentes perinucleares del espermatozoide no sólo ejercen un papel estructural, sino una función adicional en la activación del ovocito (70).

Por último, se están realizando estudios que prueban la importancia del centrosoma en la fertilización, demostrándose que determinados fallos de fecundación pueden estar asociados a anomalías en el centrosoma: fallos del espermatozoide para nuclear los microtúbulos después de la incorporación espermática, fallo en la elongación de los microtúbulos después de la formación del áster, o bien la separación del centrosoma de la cabeza espermática (71). Así, defectos del centrosoma revelan una nueva causa de fallo de fecundación que no se resuelve por ICSI.

## **7. - Calidad embrionaria y fallos de implantación**

La mala calidad embrionaria es uno de los factores pronósticos más importantes que deciden el éxito de la FIV. Se habla de mala calidad de los embriones, cuando existen más del 25% de fragmentos en los mismos, o poseen blastómeras de tamaño irregular (72).

En 1998 Minaretzis y cols (73) publicaron un trabajo en el cual analizaban los diversos factores que pueden ayudar a predecir la posibilidad de gestación en FIV, encontrándose que la tasa de embarazo se correlaciona principalmente con los embriones de 2, 3 y 4 células a las 48 horas, con una buena calidad y sin fragmentación.

Las causas de que una pareja posea embriones de mala calidad, son múltiples, pero en general es debido a factor masculino (espermatozoides anómalos) (42, 43), o factor femenino (mala calidad ovocitaria) (67, 69). En este último aspecto, uno de los motivos que pueden incidir en los fallos repetidos de FIV, es el engrosamiento anormal de la zona pelúcida del ovocito (74). En estos casos se compromete el hatching del embrión y por consiguiente la gestación. Frente a esto, algunos autores proponen la realización del hatching asistido, sobre todo en pacientes de más de 38 años, aunque no existe opinión unánime al respecto (75-77)

En ocasiones, también es posible encontrar que se obtienen sistemáticamente embriones anómalos con gametos aparentemente normales. Ya se han comenta-

do anteriormente los estudios que prueban el origen genético de muchos de los defectos (50), así como alteraciones en el núcleo espermático no detectables a simple vista, pero que originan embriones anómalos (67)

Respecto a los fallos de implantación, también se ha mencionado la influencia negativa que ejerce la inducción de la ovulación en la calidad endometrial para que pueda realizarse la implantación, todavía más en los casos de hiperestimulación. Otras veces, existe un endometrio inadecuado aún en ciclos naturales, y los factores bioquímicos alterados que impiden una adecuada implantación. Burke y cols (78) demostraron que las dos variables más importantes para predecir el éxito de una transferencia embrionaria son el transfer a la primera, y el número de embriones de buena calidad transferido.

En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones en el ámbito molecular sobre este tema, con el fin de mejorar los conocimientos sobre los fallos de implantación (79,80), pero aún hay mucho camino que recorrer, sobre todo cuando el origen es desconocido.

## **8. - Laboratorio de Reproducción Asistida**

El laboratorio de FIV es uno de los ejes principales alrededor de los cuales gira el éxito o el fracaso de un procedimiento de Reproducción Asistida.

Es imprescindible que exista una buena coordinación entre los miembros del equipo: clínicos y embriólogos, así como un control de calidad externo e interno que aseguren un perfecto funcionamiento de todo el sistema (81). Factores tales como el funcionamiento perfecto de incubadores (temperatura, pH, atmósfera), apropiados medios de cultivo y material fungible empleado, son imprescindibles para que no exista ninguna interferencia con los resultados. El empleo de protocolos en el laboratorio (82), es muy importante a la hora de establecer la infraestructura básica para una buena práctica.

Otro de los aspectos cruciales para que el laboratorio de FIV funcione adecuadamente es el control del aire, sobre todo en lo que puede afectar al desarrollo embrionario. En este tema, el equipo de Cohen es pionero, y ha establecido medidas estándar para regular los componentes posibles en la atmósfera (83, 84)

En conclusión, cualquier alteración en el laboratorio de fecundación in vitro puede afectar negativamente a los embarazos conseguidos por un grupo. Estos factores pueden resumirse en: comunicación entre clínicos y laboratorio, personal experto y especializado, control del ambiente externo, aparatos y medios de cultivo empleados.

## 9. - Transferencia embrionaria

La transferencia de embriones es el último paso en el proceso de Fecundación in vitro. En prácticamente todos los centros se realizan de forma ciega, sin tener en cuenta la vital importancia que supone para el éxito del proceso. No existen muchos trabajos publicados sobre las variables que intervienen en la transferencia, y como pueden interferir en los resultados. Factores como el tipo de catéter empleado, tiempo en realizar el proceso, y procedimiento, no han sido revisados con mucho entusiasmo por la literatura. Existen publicaciones que revisan las causas potenciales que pueden influir en los resultados de una transferencia, como el de Woolcott y cols (85). Incluso se ha publicado un trabajo en el año 2000 (86) que relaciona el tamaño y posición del útero con la tasa de implantación y embarazo clínico en FIV, sugiriendo que el tamaño del útero es un factor crítico en la etiología del embarazo ectópico en FIV-ICSI. Sin embargo, no existe demasiada literatura sobre las pautas a seguir.

Últimamente se ha prestado interés a la diferencia entre realizar la transferencia con y sin empleo de la ultrasonografía. En este sentido, hay autores que no han comprobado diferencias con el uso o no de la ecografía (87), mientras que otros grupos, como Kan y col (88) si lo han hecho (sobre todo en mujeres mayores o con dificultades para la transferencia). En otros estudios, se hace referencia a la influencia de las contracciones del endometrio en los posibles fallos de FIV (89). Un trabajo muy reciente demuestra que, por otra parte, es importante tener en cuenta el médico que realiza la transferencia (90), ya que el embarazo clínico variaba significativamente desde el 17% al 54% dependiendo de quién realiza la transferencia.

En conclusión, al igual que en el resto de las etapas del proceso de FIV, hay que prestar atención a la transferencia de embriones, cuidando de que sea lo más esmerada posible, eligiendo el catéter adecuado, y sin causar traumas, sangrado o lesión que pueda afectar a la posterior implantación embrionaria.

### **MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA (ICSI) TRAS FALLO DE FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)**

En los últimos años se han publicado numerosos trabajos en los cuales se intenta estudiar la relación entre fallos previos de FIV y los posteriores resultados de ICSI. Estos resultados incluyen tasa de fecundación, gestación, implantación y niños nacidos vivos. Sin embargo, los datos aportados por la literatura

son contradictorios. Analizando los más recientes, comprobamos que Miller y cols (91) comparan dos grupos de pacientes a los que se les realiza un ciclo de ICSI: pacientes con factor masculino exclusivamente, y pacientes que han tenido un ciclo previo con fallo de FIV. Estos autores aseguran que con un fallo previo de FIV, existe un peor pronóstico de embarazo. Sin embargo, en el mismo año, el grupo de Mercan (92), concluye que no existe relación entre los resultados de ICSI y la historia anterior (semen, edad, baja tasa de fecundación en FIV). También en el mismo año, Khalifa y cols (93), estudiaron el valor del ICSI tras repetidos fallos de FIV frente a casos con factor masculino severo. Aunque no existieron diferencias en la tasa de gestación, si las había en cuanto a la tasa de división y al número de triploidías. Estos autores concluyen que estas diferencias pueden deberse a la mala calidad ovocitaria, por lo que proponen una mejor evaluación de la maduración de los ovocitos y calidad de los mismos. Curiosamente, en 1998 también, Tomas y cols (94) llegan a la misma conclusión con diferentes resultados. Comparando igualmente dos grupos: fallo de FIV y factor masculino severo, se obtiene una significativamente menor tasa de gestación con un fallo previo de FIV (19,5% frente a 33,5%). La tasa de implantación también es menor en este grupo que en el de factor masculino (9,6% frente a 19,5%). Este grupo también relaciona estas diferencias con defectos de los ovocitos, que no pueden ser solucionados con el ICSI.

El grupo de Palermo (Moomjyl y cols (95) estudió las implicaciones de los fallos completos de fecundación en ICSI en subsecuentes ciclos. Estos autores comprobaron, que tras un ciclo de ICSI con fallo total de fecundación, podría obtenerse fecundación en ciclos subsecuentes. El fallo total de fecundación en ICSI no predice los resultados posteriores excepto en los siguientes casos: teratozoospermia o astenozoospermia totales, y mala calidad ovocitaria. Una vez más aquí, constatamos la gran importancia de la calidad ovocitaria en el éxito de cualquiera de las técnicas de Reproducción Asistida.

Como ya se ha comentado anteriormente al hablar de la importancia del espermatozoide, se está dando más protagonismo al gameto masculino a la hora de comprobar el origen de muchos fallos de fecundación. En este sentido, se han publicado trabajos recientes en esta línea. Esterhuizen y cols (96) relacionan el defecto en el empaquetamiento de la cromatina con fallos de FIV, e indican que este test debería ser un ensayo complementario en el diagnóstico del factor masculino. Liu y Baker, ya en el 2001 demuestran que la principal causa del fallo de fecundación es un

defecto en la interacción zona pelúcida-espermatozoide. La incubación de ovocitos de 68 parejas con una tasa de fecundación in vitro de cero, y sin unión de espermatozoides a la zona, y espermatozoides de donantes fértiles, resultó en una unión normal de espermatozoides a la zona pelúcida. Por lo tanto, concluyen, que la mayoría de las veces la imposibilidad de unión de los espermatozoides a la zona se debe a defectos de estos últimos (97).

Así las cosas, actualmente se debate la necesidad de realizar siempre ICSI a todas las parejas que requieran fecundación in vitro, independientemente del diagnóstico. De esta forma, y según algunos grupos (98), el ICSI ofrecería la posibilidad de obviar los fallos de fecundación in vitro convencional, maximiza el número de embriones y ocasiona, en fin, menor costo económico a la paciente, ya que se evitaría per-

der un ciclo por fallo de FIV. Esta postura, no obstante, tiene muchos detractores, ya que, en primer lugar, el ICSI todavía no está lo suficientemente garantizado como para sustituir al FIV. En este sentido, se proponen soluciones como la de fertilizar los ovocitos que han fallado la fecundación en FIV con microinyección (99), obteniéndose unas tasas de gestación del 20%. Otra posibilidad (la que, por otra parte, es más ampliamente aceptada por la mayoría de los centros) es la fecundación, en un ciclo de FIV, de la mitad de los ovocitos con FIV convencional, y la otra mitad con ICSI (100, 101). De esta forma, se evitan las sorpresas de los fallos de FIV en esterilidad de origen desconocido, y se le ofrece a la paciente la posibilidad de una transferencia embrionaria, sin necesidad de obviar la inseminación convencional.

#### RESUMEN DE LOS PRINCIPALES FACTORES QUE INCIDEN SOBRE LOS FALLOS DE FIV

Número de intentos de FIV	Máximo de 4 ciclos
Inducción de la ovulación	FSH sola o con hMG Evitar la Hiperestimulación ovárica.
Edad de la mujer	Menos de 40 años, y aconsejable menos de 38
Endometriosis	
Calidad ovocitaria	Afecta negativamente, aunque depende del estadio. Morfología adecuada Disrupción del 2º corpúsculo polar Formación del pronúcleo femenino
Factores genéticos	Estudio genético de la pareja o del cigoto y/o embriones.
Factor masculino	Anomalías del núcleo espermático (integridad ADN, con densación de la cromatina) Centrosoma
Calidad embrionaria	Por defectos del ovocito, el espermatozoide o ambos. Defectos genéticos
Implantación	Endometrio inadecuado, factores bioquímicos desconocidos. Hiperestimulación.
Laboratorio de Embriología	Personal especializado, material y medios de cultivo adecuados. Medio ambiente
Transferencia de embriones	Cánulas, técnica adecuada, personal entrenado.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Palermo GD, Neri QV, Hariprashad JJ, Davis OK, Veeck LL, Rosenwaks Z.:** ICSI and its outcome. *Semin Reprod Med* 2000; 18 (2): 161-9
2. **European IVF-Monitoring Programme T.T.:** Assisted reproductive technology in Europe, 1997. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2001 Feb; 16 (2): 384-91.
3. **Núñez Calonge R, García Enguádanos A, Cortés S, Sarrias O, González J, Caballero Peregrín P.:** Edad y Reproducción (en prensa)
4. **Van den Bergh M, Emiliani S, Biramene J, Vannin AS, Englert Y.:** Impact of the introduction of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on the treatment of severe male sterility. *Rev Med Brux* 1999 Oct; 20 (85): A453-6.
5. **Padilla SL, García JE.:** Effect of maternal age and number of IVF procedures on pregnancy outcome. *Fertil Steril* 1989; 52/2 (270-273).
6. **Guzick DS, Grefenstette I, Baffonek et al.:** Infertility evaluation in fertile woman: A model for assessing the efficacy of infertility testing. *Human Reprod* 1994; 9/12: 2306-2310.
7. **Engman L, Maconochie N, Bekir JS, Jacobs HS and Tan SL.:** Cumulative probability of clinical pregnancy and live birth after a multiple cycle IVF. *Br. J. Obstet. Gynaecol* 1999; 106/2: 165-170.
8. **De Vries MJ, De Sutter P, Dhont M.:** Prognostic factors in patients continuing in vitro fertilization intracytoplasmic sperm injection treatment and dropouts. *Fertil Steril* 1999 Oct; 72 (4): 674-8.
9. **Fukuda J, Kumagai J, Kodama et al.:** Upper limit of the number of IVF-ET treatment cycles in different age groups, predicted by cumulative take-home baby rate. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001 Jan; 80.
10. **Mercan R, Mayer JF, Walker D et al.:** Improved oocyte quality is obtained with follicle stimulating hormone alone than with follicle stimulating hormone/human menopausal gonadotrophin combination. *Human Reprod* 1997; 12:9, 1886-1889.
11. **Sills ES, Schattman GL, Veeck LL, Liu HC, Prasad M and Rosenwaks Z.:** Characteristics of consecutive in vitro fertilization cycles among patients treated with follicle-stimulating hormone (FSH) and human menopausal gonadotropin versus FSH alone. *Fertil Steril* 1998; 69:5, 831-835.
12. **Crain JL et al.:** Outcome comparison of in vitro fertilization treatment with highly purified subcutaneous follicle-stimulating hormone (Fertinex, a urofollitropin) versus intramuscular menotropins. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1998; 179:2, 299-307.
13. **Jacob S, Drudy L, Conroy R and Harrison RF.:** Outcome from consecutive in vitro fertilization intracytoplasmic sperm injection attempts in the final group treated with urinary gonadotrophins and the first group treated with recombinant follicle stimulating hormone. *Human Reprod* 1998; 13:7., 1783-1787.
14. **Weissman A, Meriano J, Ward S, Gotlieb L and Casper RF.:** Intracytoplasmic sperm injection after follicle stimulation with highly purified human follicle-stimulating hormone compared with human menopausal gonadotropin. *J Assisted Reprod Genet* 1999; 16:2, 63-68.
15. **Agrawal R, Holmes J, Jacobs HS.:** Follicle-stimulating hormone or human menopausal gonadotropin for ovarian stimulation in in vitro fertilization cycles: a meta analysis. *Fertil Steril* 2000 Feb; 73 (2): 338-43.
16. **Westergaard LG, Erb K, Laursen S, Rasmussen PE, Rex S.:** The effect of human menopausal gonadotrophin and highly purified, urine-derived follicle stimulating hormone on the outcome of in vitro fertilization in down regulated normogonadotrophic women. *Hum Reprod* 1996; 11 (6): 1209-13.
17. **Schats R, Sutter PD, Bassil S, Kremer et al.:** Ovarian stimulation during assisted reproduction treatment: a comparison of recombinant and highly purified urinary human FSH. On behalf of The Feronia and Apis study group. *Human Reprod* 2000 Aug; 15 (8): 1691-7.
18. **Simberg N, Tulppala M et al.:** Comparison of busarelin and nafarelin in IVF cycles and in subsequent frozen-thawed embryo transfer cycles. *Acta Obstet. Gynecol. Scand* 1998; 77:8, 854-859.
19. **May JV.:** Ovarian hyperstimulation: Effects on oocyte quality and communication between physician and embryologist to optimize oocyte quality. *Infertil. Reprod. Med, Clin. North Am* 1998; 9:2, 163-179.
20. **Dechaud H, Anahory T, Aligier N, Arnal F, Humeau C, Hedon B.:** Coasting: a response to excessive ovarian stimulation. *Gynecol Obstet Fertil* 2000 Feb; 28 (2): 115-9.
21. **Evers JI, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA.:** Elevated levels of basal estradiol-17 beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998 Jun; 69 (6):1010-4.
22. **Sharara FI, McClamrock HD.:** High estradiol levels and high oocyte yield are not detrimental to in vitro

- fertilization outcome. *Fertil Steril* 1999 Sep; 72(3): 401-5.
23. **Basir GS, O WS, Yu Ng EH, Ho PC.:** Morphometric analysis of peri-implantation endometrium in patients having excessively high oestradiol concentrations after ovarian stimulation. *Human Reprod* 2001 Mar; 16 (3): 435-40.
  24. **Hutchinson-Williams KA, DeCherney AH, Lavy G, Diamond MP, Naftolin F, Lunenfeld B.:** Luteal rescue in an in vitro fertilization-embryo transfer program, *Fertil Steril* 1990; 53:495-501.
  25. **Buvat J, Macrolin G, Guittard C, Herbaut H, Louvet AL, Dehaene J.:** Luteal support after luteinizing hormone-releasing hormone agonist for in vitro fertilization: superiority of human chorionic gonadotropin over oral progesterone, *Fertil Steril* 1990; 53: 490-4.
  26. **Fanchin R, Ayoubi JM, Olivennes F et al.:** Hormonal influence on the uterine contractility during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 2000 Jun; 15 Suppl 1; 90-100.
  27. **Fitzgerald C, Zimon AE, Jones EE.:** Aging and reproductive potential in women. *Yale J Biol Med* 1998 Sep-Oct; 71(5): 367-81.
  28. **Te Velde ER, Dorland M, Broekmans FJ.:** Age at menopause as a marker of reproductive ageing. *Maturitas* 1998; 30:2., 119-125.
  29. **Sauer MV.:** The impact of age on reproductive potential: Lessons learned from oocyte donation. *Maturitas* 1998; 30:2, 221-225.
  30. **Lavery S, Lawrie H, Trew G, Winston R.:** Age and basal follicle stimulating hormone as predictors of in vitro fertilisation outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105:7, 810-812.
  31. **Bar ?, Hava I, Ferber A, Ashkenazi J, et al.:** Does female age affect embryo morphology ? *Gynecol Endocrinol* 1999 Dec; 13 (6): 371-4.
  32. **Sharif K et al.:** Age and basal follicle stimulating hormone as predictors of in vitro fertilization outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105:1., 107-112.
  33. **Yanushpolsky EH, Best CL, Jacson KV et al.:** Effects of endometriomas on oocyte quality, embryo quality and pregnancy rates in vitro fertilization cycles: A prospective, case-controlled study. *J Assisted Reprod Genet* 1998; 15:4., 193-197.
  34. **Pal L, Shifren JL, Isaacson KB et al.:** Impact of varying stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer. *J, Assist Reprod Genet* 1998; 15: 27-31.
  35. **Trumbull KA, Dmowski WP.:** Endometriosis and infertility: The role of IVF. *Middle East Fertil Soc J* 1998 ; 3:3, 197-208.
  36. **Pellicer A, Albert C, Garrido N, Navarro J, Remohí J, Simon C.:** The pathophysiology of endometriosis associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J Reprod Fert Suppl* 2000; 55: 109-19.
  37. **Nakahara K et al.:** Ovarian fecundity in patients with endometriosis can be estimated by the incidence of apoptotic bodies. *Fertil Steril* 1998; 69:5., 931-935.
  38. **Kahraman S, Yakin K, Donmez E et al.:** Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000 Nov; 15 (11): 2390-3
  39. **Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R.:** Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1998; 13:12, 3431-3433.
  40. **Serhal PF et al.:** Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1997; 12:6, 1267-1270.
  41. **Mansour RT et al.:** Abnormal oocytes: An underestimated infertility factor revealed by intracytoplasmic sperm injection. *Middle East Fertil Soc J* 1998; 3:2, 130-136.
  42. **Saito H, Saito t, Kaneko T, Sasagawa I, Luramoto T, Hiroi M.:** Relatively poor oocyte quality is an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2000 Mar; 73 (3): 465-9.
  43. **Suppinyopong S, Choavaratana R, Karavakul C.:** Correlation of oocyte morphology with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *J Med Assoc Tah* 2000 Jun; 83 (6): 627-32
  44. **Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O.:** Prognostic value of first polar body morphology on fertilization and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 2000 Feb; 15 (2): 427-30.
  45. **Wittemr C, Bettahar-Lebugle K et al.:** Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Human Reprod* 2000 Dec; 15 (12): 2591-7.
  46. **Nasseri A, Grifo JA.:** Barriers to success in assisted reproduction. *Curr Probl. Obstet. Gynecol. Fertil* 1998; 21:5, 131-141.
  47. **Flaherty SP, Payne D, Matthews CD.:** Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998 Apr; 13 Suppl 1: 155-64.
  48. **Nasseri, Grifo JA.:** Genetics, age and infertility. *Maturitas* 1998; 30:2, 189-192.

49. **Warner CM, Cao W, Exley GE, MacElhinny AS, Alikani M, Cohen J, Scott RT, et al.:** Genetic Regulation of egg and embryo survival. *Human Reprod* 1998; 13 suppl.3, 178-196.
50. **Grossman M, Calafell JM, Moreno V, Balasch J, Vanrell JA, Egozcue J, Santalo J, Vidal F.:** Recurrent in vitro fertilization failure evaluated by fluorescence in situ hybridization: A case report. *Fertil Steril* 1998; 69:3, 558-560.
51. **Bedford JM, Kim HH.:** Sperm/egg binding patterns and oocyte cytology in retrospective analysis of fertilization failure in vitro. *Hum Reprod* 1993 Mar; 8 (3): 453-63.
52. **Benkhalifa M, Menezo Y, Janny L, Pouly JL, Qumsiyeb MB.:** Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J Assist Reprod Genet* 1996 Feb; 13 (2): 140-8.
53. **Peschka B, Leygraaf J, Van der Ven K, Montag M et al.:** Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999 Sep; 14 (9): 2257-63.
54. **Kahraman S, Tasdemir M, Tasdemir I, Vicdan K et al.:** Pregnancies achieved with testicular and ejaculated spermatozoa in combination with intracytoplasmic sperm injection in men with totally or initially immotile spermatozoa in the ejaculate. *Hum Reprod* 1996 Jun; 11 (6): 1343-6.
55. **Tarlatzis BC, Bili H.:** Intracytoplasmic sperm injection. Survey of world results. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 900: 336-44.
56. **Bukulmez O, Yucel A, Yarali H, Bildirici I, Gurgan T.:** The origin of spermatozoa does not affect intracytoplasmic sperm injection outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod* 2001 Feb; 94 (2):250-5.
57. **Vandervorst M, Tournaye H, Camus M, Nagy ZP, Van Steirteghem, Devroey P.:** Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997 Nov; 12 (11): 2429-33.
58. **Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, Nuhoglu A.:** Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2001 Jan; 16 (1): 125-129.
59. **Duran EH et al.:** A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Human Reprod* 1998; 13/5., 1235-1239.
60. **Hammadeh ME, Stieber M, Rosenbaum MD and Schmidt W.:** Chromatin and morphology alteration in human spermatozoa affected by freezing and thawing. *Assisted Reprod Reviews* 1998; 8/3, 131-142.
61. **Auger J, Dadoune JP.:** Nuclear status of human sperm cells by transmission electron microscopy and image cytometry: changes in nuclear shape and chromatin texture during spermiogenesis and epididymal transit. *Biol Reprod* 1993; 49: 166-175.
62. **Sailer et al.:** Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation, associated with the presence of DNA strand-breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 1995; 16:80-87.
63. **Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W.:** Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy in a IVF program, *Andrologia* 1998; 30/1: 29-35.
64. **Bergere M, Selva J, Volante M, Dumont M, Hazout A, Olivennes F, and Frydman R.:** Cytogenetic analysis of uncleaved oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *J. Assisted. Reprod. Genet* 1995; 12:5, 322-325.
65. **Lopes S, Jurisicova A, Casper R.:** Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection, *Human Reprod* 1998; 13, 703-708
66. **Bedford JH, Kim HH.:** Sperm/egg binding patterns and oocyte cytology in retrospective analysis of fertilization failure in vitro. *Human Reprod* 1993; 8; 453-463.
67. **Sakkas D, Urner F, Bizzarro D et al.:** Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reprod* 1998; 13:4, 11-16.
68. **Larson KL, De Jonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP.:** Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000 Aug; 15(8): 1717-22.
69. **Moilanen JM, Tulppala M, Reima I, Hovatta O.:** Fertilization, embryo quality, and cryosurvival in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *J. Assisted Reprod Genet* 1999; 16: 1, 17-23.
70. **Kimura Y, Yanagimachi R et al.:** Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvements of sperm perinuclear material. *Biol Reprod* 1998; 58/6; 1407-1415.
71. **Hewitson L, Simerly C, Schatten G.:** Inheritance defects of the sperm centrosome in humans and its possible role in male infertility, *Int J Androl Suppl* 1997; 20/3., 35-43.

72. **Desai NN, Godstein J, Rowland DY, Goldbarb JM.:** Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod* 2000 Oct; 15 (10): 2190-6.
73. **Minaretzis D, Harris D, Alper DD, Mortola J, Berjer MJ and Power D.:** Multivariate analysis of factores predictive of successful live births in in vitro fertilization (IVF) suggests strategies to improve IVF outcome. *J. Assisted Reprod. Genet* 1998; 15-6, 365-371.
74. **Gabrielsen A, Bhatnager PR, Petersen K, Lindenberg S.:** Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 2000 Jul; 17 (6): 323-6
75. **Letterie GS.:** Assisted hatching: Rationale, technique and clinical outcomes. *Assisted Reprod. Rev* 1998; 8:3, 116-125.
76. **Meldrum DR, Wisot A et al.:** Assisted hatching reduces the age-related decline in IVF outcome in women younger than age 43 without increasing miscarriage or monozygotic twinning. *J. Assisted Reprod. Genet* 1998; 15:7., 418-421.
77. **Domitrz J, Wolczynski S, Syrewicz M et al.:** Enzymatic assisted hatching in the infertile couple after failed attempts of IVF ET. *Ginekol Pol* 2000 Sept; 71(9): 1047-52.
78. **Burke LM, Davenport AT, Russell B, Deaton JL.:** Predictors of success after embryo transfer: experience from a single provider. *Am J Obst Gynecol* 2000 May; 182 (5): 1001-4.
79. **Wiemer KE, Cohen J et al.:** The application of culture in assisted reproduction: 10 years of experience with human embryos. *Human Reprod* 1998; 13:4, 11-16.
80. **Sargent IL, Martin KL and Barlow DH.:** The use of recombinant growth factors to promote human embryo development in serum free medium. *Human Reprod* 1998; 13:4, 11-16.
81. **Matson P.:** Internal quality control and external quality assurance in the IVF laboratory. *Human Reprod* 1998; 33:4, 156-160.
82. **Dawson KJ et al.:** The training of clinical embryologist: a report on a new qualification. *Human Reprod* 1996; 11 (Natl. Suppl) 68-70.
83. **Cohen J, Gilligan A, Esposito W et al.:** Ambient air and its potential effects on conception in vitro. *Human Reprod* 12, 1742-1749.
84. **Hall J, Gilligan A, Schimmel T, Cecchi M, Cohen J.:** The origin, effects and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture. *Human Reprod* 1998; 13., 146-148.
85. **Woolcott R, Stanger J.:** Potentially important variables identified by transvaginal ultrasound guided embryo transfer. *Human Reprod* 1997; 12:5, 963-966.
86. **Egbase PE, Al-Sharhan M, Grudzinskas JG.:** Influence of position and length of uterus on implantation and clinical pregnancy rates in IVF and embryo transfer treatment cycles. *Hum Reprod* 2000 Sep; 15 (9): 1943-6.
87. **Al Shawaf T et al.:** Transfer of embryos into the uterus: how much do technical factors affect pregnancy rates ? *J Assist Reprod Genet* 1993; 10, 31-36.
88. **Fanchin R et al.:** Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in vitro fertilization. *Human Reprod* 1998; 13, 1968-1974.
89. **Kan AK, Abdalla et al.:** Embryo transfer: ultrasound-guided versus clinical touch. *Human Reprod* 1999; 14:5, 1259-1261.
90. **Hearns Stokes RM, Miller BT, Scott L, Creuss D, Chakraborty PK, Segars HJ.:** Pregnancy rates after embryo transfer depend on the provider at embryo transfer. *Fertil Steril* 2000 Jul; 74 (1): 80-6.
91. **Miller KF, Falcone T et al.:** Previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization is associated with poor outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69:2., 242-245.
92. **Mercan R, Oehninger S et al.:** Impact of fertilization history and semen parameters on ICSI outcome. *J. Assisted. Reprod, Genet* 1998; 15:1, 39-45.
93. **Khalifa EA, et al.:** The value of ICSI in cases of repeated fertilization failure in IVF versus cases with severe male infertility. *Middle East Fertil Soc. J* 1998; 3:3, 260-266.
94. **Tomas C, Orava M et al.:** Low pregnancy rate is achieved in patients treated with intracytoplasmic sperm injection due to previous low or failed fertilization in in vitro fertilization. *Human Reprod* 1998; 13:1, 65-70.
95. **Moomjyl M, Sills ES, Rosenwaks Z, Palermo GD.:** Implications of complete fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection for subsequent fertilization and reproductive outcome. *Human Reprod* 1998; 13:8., 2212-2216.
96. **Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Van Zyl C et al.:** Chromatin packaging as an indicator of human sperm dysfunction. *J Assist Reprod Genet* 2000 Oct; 17 (9): 508-14.
97. **Liu DY, Baker HW.:** Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000 Mar; 15 (3): 702-8.

98. **Fishel S, Aslam I, Lisi F, Rinaldi L et al.:** Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in vitro conception ? *Hum Reprod* 2000 Jun; 15 (6): 1278-83.
99. **Park KS, Song HB, Chun SS.:** Late fertilization on unfertilized human oocytes in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles: conventional insemination versus ICSI. *J Assist Reprod Genet* 2000 Sep; 17 (8): 419-24.
100. **Khamsi F, Yavas Y, Roberge S, Sacanna I, Wong JC, Endman M.:** The status of controlled prospective clinical trials for efficacy of intracytoplasmic sperm injection in in vitro fertilization from non male factor infertility. *J Assist Reprod Genet* 2000 Oct; 17 (9): 504-7.
101. **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 randomised study. *Fertil Steril* 2001 Feb; 75(2): 342-7.