

La reproducción asistida: un nuevo horizonte para los pacientes con fibrosis quística

Assisted Reproduction: new approach for the cystic fibrosis patients

Romero M.P

Centro ginecológico Dres. Povedano. Córdoba. España

Resumen

En el presente trabajo se analizan las perspectivas que las técnicas de reproducción asistida han abierto para los pacientes con fibrosis quística (FQ), considerados infértiles hasta hace poco tiempo. La mayor esperanza de vida que estos pacientes tienen en la actualidad hace que los problemas reproductivos asociados con la enfermedad hayan cobrado mayor importancia. Se presentan las técnicas terapéuticas más indicadas, y se valora la importancia que el estudio genético, el diagnóstico genético preimplantacional y el consejo genético tienen en el caso de estos pacientes.

Palabras clave: Fibrosis quística. Reproducción asistida. MESA. ICSI. DGP.

Summary

In the present work, the prospects that the assisted reproduction techniques have opened for the cystic fibrosis patients, traditionally considered as infertile, are analyzed. Due to the higher span of life of these patients at the present time, the reproductive problems associated with the disease have acquired great importance. The therapeutical techniques appropriated for each case are presented, and the importance that the genetic screening, the preimplantation genetic diagnosis and the genetic counseling have for these patients is assessed.

Key words: Cystic fibrosis. Assisted reproduction. MESA. ICSI. PGD.

Correspondencia: M^a Paz Romero
Laboratorio de reproducción
centro ginecológico Dres. Povedano
C/ Poeta Valdelomar Pineda, 15
14012 Córdoba

LA FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística (FQ) o mucoviscidosis es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva grave más frecuente en la raza blanca. Considerada hasta hace pocos años una enfermedad pediátrica, en la actualidad la esperanza de vida de los pacientes con FQ se ha prolongado de manera espectacular, de forma que el 50-80% de ellos alcanzan la edad adulta. El diagnóstico precoz de la enfermedad, así como los avances realizados en el tratamiento antibiótico de las infecciones respiratorias y del estado nutritivo del paciente mediante la administración de enzimas pancreáticas, han sido fundamentales en el incremento de la esperanza de vida de estos pacientes. El trasplante de pulmón se ha convertido en una opción para aquellos pacientes en estadios terminales de la enfermedad.

La FQ es una enfermedad hereditaria que se transmite de forma autosómica recesiva. Se estima que su prevalencia es de 1/2500 nacidos vivos en la raza blanca y 1/17000 nacidos vivos en la raza negra. La frecuencia de portadores es de 1/25 nacidos vivos. Al tratarse de una enfermedad autosómica recesiva, la probabilidad de tener un hijo enfermo en parejas en que ambos miembros son portadores es del 25%, mientras que la probabilidad de tener un hijo portador es del 50%.

La enfermedad se caracteriza por la afección de las glándulas de secreción exocrina, y se manifiesta por trastornos respiratorios y gastrointestinales. Se produce un aumento en la viscosidad de las secreciones mucosas de determinados órganos, produciéndose la obstrucción de los conductos secretores de éstos, al tiempo que se observa una elevación de electrolitos en el sudor. Se trata de una enfermedad multisistémica que afecta a los aparatos digestivo, respiratorio y reproductor, si bien en el 80-90% de los casos la enfermedad se manifiesta en la infancia por síntomas respiratorios y/o insuficiencia pancreática. Aparece además un retraso en el desarrollo, signos de falta de vitaminas y anemia como consecuencia de la falta de digestión de los alimentos por carencia de las enzimas pancreáticas. El cuadro clínico de los afectados de FQ presenta insuficiencia pancreática seguida de prolapso rectal, obstrucción intestinal por aumento de la viscosidad de las secreciones intestinales, lesiones hepáticas de distinto grado (pudiendo llegar hasta una cirrosis hepática), y obstrucción mucosa de las vías aéreas con infecciones de repetición del aparato respiratorio, con lesiones pulmonares que evolucionan hacia la insuficiencia respiratoria y el cor pulmonale,

que es la causa más frecuente de muerte en los pacientes con FQ.

Los pacientes varones presentan azoospermia secundaria a la aplasia del cordón espermático, de las vesículas seminales y el epidídimo en el 95% de los casos, lo que los convierte en estériles. La fertilidad en las mujeres es más elevada que en los varones, aunque también está alterada por el aumento de la viscosidad del moco cervical; en ellas el desarrollo sexual, el ciclo menstrual y la fecundidad están más afectados por las manifestaciones respiratorias y nutricionales de la enfermedad que por efectos directos de la mutación.

Los estudios fisiopatológicos han demostrado que el defecto de la FQ está situado a nivel de la regulación del transporte iónico de las células epiteliales exocrinas. La concentración de electrolitos en el sudor de los pacientes con FQ está altamente elevada, y su determinación constituye una importante prueba diagnóstica. El diagnóstico se establece mediante el test del sudor, que consiste en la inyección de pilocarpina en una zona de la piel y la posterior recogida del sudor de dicha zona; cuando la concentración de cloro o sodio es mayor de 60 mEq/L, se confirma el diagnóstico. Aproximadamente el 98% de los pacientes afectados de FQ dan positivo el test del sudor. Dado que el diagnóstico precoz alarga la vida de estos pacientes, es necesario realizar una prueba diagnóstica en los recién nacidos en los que se sospecha la enfermedad o que tengan antecedentes familiares.

CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

El método que condujo a la identificación de la región cromosómica que se encuentra mutada en la FQ (7q31-32) se basó en los estudios de ligamiento genético (revisado en: 1, 2). En 1985 se obtuvieron datos de ligamientos positivos con varios marcadores de ADN situados en el brazo largo del cromosoma 7. Estudios posteriores demostraron que el gen de la FQ se encuentra entre los marcadores MET y J3.11, a una distancia genética menor de 1 cM respecto a cada uno de estos marcadores (3). En el caso de la FQ no existen deleciones macroscópicas ni marcadores citogenéticos que faciliten su localización. El descubrimiento de nuevos marcadores con una intensa asociación alélica con la enfermedad permitió limitar la región en la que se encuentra el gen FQ a menos de 300 kb (4); el análisis con secuencias derivadas de esta región cromosómica permitió finalmente aislar un cDNA de 6129 pb (5), que se extiende en una región

genómica de cerca de 250 kb que consta de 27 exones. La secuencia de aminoácidos para la que codifica este gen supone una proteína de 1480 aminoácidos; se trata de un canal de cloro regulado mediante fosforilación, que se localiza en la membrana apical de las células epiteliales (6).

El análisis del gen normal y del gen FQ mutado permitió observar una delección de tres bases en el codón 508 (mutación delta F508), que da lugar a la pérdida de una fenilalanina (7). Esta delección se produce en una zona clave de la proteína conocida como CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística), que es un canal de cloro. Esta mutación ha sido encontrada en el 75% de los cromosomas FQ del norte de Europa y Norteamérica; sin embargo, la situación no es la misma en todo el mundo, y en España sólo el 50% de los cromosomas FQ tienen esa mutación, datos que han sido confirmados también para la población italiana y griega (8). Morral y cols (9) han estudiado el origen y evolución de la mutación delta F508 en Europa, así como las causas de las variaciones observadas en la frecuencia de la misma en diferentes países.

Se conocen más de 800 mutaciones en el gen CFTR, que se distribuyen a lo largo de todo el gen, aunque con mayor frecuencia en unas regiones que en otras. Estas mutaciones pueden corresponder a cambios de un aminoácido por otro por lo que, aunque resulte una proteína de tamaño normal, su función estará alterada (mutación missense); el resto corresponde a mutaciones sin sentido (nonsense, aparición de un codon stop), de cambio en el marco de lectura (frameshift), o mutaciones que afectan a la maduración o splicing del ARN.

Las distintas mutaciones en el gen CFTR dan lugar a fenotipos con una mayor o menor severidad de los síntomas. Así, los pacientes con la mutación delta F508 en homocigosis presentan la forma más severa de la enfermedad, en particular desde el punto de vista de la afectación pancreática. Otras mutaciones se asocian con una mayor variabilidad de expresión clínica. Tal es el caso de la mutación denominada alelo 5T (mutación IVS8-6(5T)), en la cual se produce un error en el procesado y maduración del ARN para el CFTR. Como consecuencia, el 60-90% de los ARNm pierden el exón 9 por un procesamiento alternativo, y el resultado es una proteína anómala; esta proporción es suficiente como para impedir los síntomas más graves de la enfermedad (respiratorios, ...), pero persistiendo los problemas de infertilidad asociados a la CBAVD. La mutación 5T es la mutación moderada más frecuente en pacientes FQ con azoospermia obs-

tructiva. Los estudios histológicos sugieren que esta proteína alterada influye en la disminución del número de espermatozoides maduros en el túbulo (10).

LA INFERTILIDAD MASCULINA EN LOS PACIENTES CON FQ

El desarrollo de las técnicas terapéuticas ha aumentado considerablemente la esperanza de vida de los pacientes afectados de FQ. Actualmente estos pacientes alcanzan la edad reproductiva con mayor facilidad, por lo que los problemas reproductivos asociados han cobrado mayor importancia. Por otra parte, también se han descrito problemas de infertilidad masculina entre la población de hombres portadores de mutaciones para el gen de CFTR; el hecho de que estos problemas puedan ser superados mediante el uso de técnicas de reproducción asistida podría incrementar el riesgo de transmisión de la FQ a los descendientes.

Los pacientes afectados de FQ presentan ausencia congénita de conductos deferentes, no susceptible de ser resuelta mediante cirugía. Se trata de una azoospermia obstructiva, por lo que la espermatogénesis está conservada, produciéndose espermatozoides en los testículos pero encontrándose bloqueado su transporte. Los problemas asociados con el desarrollo de los vasos deferentes dan lugar a una ausencia uni- (CUAVD) o bilateral (CBAVD) congénita. Patrizio y Salameh (11) estudiaron el patrón de expresión del ARNm del gen CFTR en el epidídimo de hombres que presentaban algún tipo de obstrucción, y comprobaron la ausencia de expresión del gen, así como cambios en las células epiteliales del epidídimo. La incidencia aproximada de CBAVD entre los hombres afectados de FQ es del 97%, por lo que dichos hombres son infértiles (azoospermicos), a menos que recurran a las técnicas de reproducción asistida. Se ha observado una elevada proporción de hombres (50-82%) portadores de mutaciones para el gen del CFTR entre los afectados de CBAVD, y una incidencia algo menor (43%) entre los afectados de CUAVD (12). En el caso de la CBAVD de portadores se encontró, como causa más frecuente, la asociación de un gen mutado con la variante genética 5T.

Otro aspecto importante es la posible relación entre la FQ y una baja calidad espermática. Algunos autores proponen una relación entre las mutaciones para el gen del CFTR en los casos en que no se produce CBAVD (es decir, portadores no afectados) y una baja calidad espermática, como consecuencia de defectos en el transporte de fluidos y electrolitos a nivel epididi-

dimal asociados a las mutaciones del gen del CFTR (13). La consecuencia directa de esta posible relación FQ-baja calidad espermática sería un incremento de la frecuencia de mutaciones para el gen del CFTR entre los hombres infértiles con baja calidad espermática respecto a la población general (14). Otros autores, sin embargo, no observan dicha asociación (15), concluyendo que los defectos del gen CFTR no están implicados en la calidad espermática de hombres sanos en los que ésta se encuentra disminuida.

LA FIBROSIS QUÍSTICA Y LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

1. La inseminación artificial

Es la técnica de reproducción asistida más sencilla y menos costosa. Es la técnica de elección en parejas en que la mujer presenta fibrosis quística, siempre que el varón no sea portador; al tratarse de una enfermedad autosómica recesiva, la probabilidad de que la descendencia de una pareja formada por un individuo afectado y otro portador sea portadora de la mutación es del 50%, siendo la probabilidad de un hijo afectado también del 50%. Las mujeres con fibrosis quística presentan un moco cervical más espeso de lo normal, lo que dificulta el paso de los espermatozoides por el cuello cervical. El uso de la inseminación artificial intrauterina permite superar esta barrera, introduciendo directamente el semen, previamente capacitado en el laboratorio, directamente a la cavidad uterina. El uso de esta técnica sólo es posible en el caso de mujeres que presenten al menos una trompa permeable (valorable mediante histerosalpingografía). En el caso de mujeres con fibrosis quística es esencial además una valoración del estado clínico de la paciente antes del embarazo, fundamentalmente del estado nutricional, el estado pulmonar, y la estabilidad de la función respiratoria en los años precedentes. Asimismo, habrá que hacer un seguimiento de la medicación de la madre durante el embarazo, llevar un estricto control de peso, y tratar de acortar la duración del parto por el sobreesfuerzo y el trabajo físico que supone para la madre.

La inseminación artificial con semen de donante (IAD) es una opción en el caso de varones con fibrosis quística.

2. La fecundación in vitro

La aparición de la fecundación in vitro (FIV) abrió la posibilidad de tener hijos a numerosas pare-

jas con infertilidad de causas muy variadas, entre las que se encuentran numerosos casos de infertilidad de origen masculino (16). El desarrollo de un protocolo combinado que incluye la microaspiración de espermatozoides epididimarios (MESA) y la fecundación in vitro (FIV) permitió el tratamiento de aquellos pacientes con ausencia bilateral de deferentes (CBAVD) (17, 18), aunque esta técnica es aplicable a todos los casos de azoospermia obstructiva.

El problema que presenta la técnica combinada MESA-FIV es la baja tasa de fecundación, debido fundamentalmente a la mala calidad de los espermatozoides recuperados del epidídimo (19, 20). Se ha comprobado que la microaspiración debe hacerse en las regiones más proximales del epidídimo, donde los espermatozoides se han producido más recientemente, ya que los espermatozoides obtenidos de las regiones más distales son mayoritariamente inmóviles, debido al envejecimiento en el sistema obstruido (21, 22), observándose además gran cantidad de macrófagos. Sin embargo, los espermatozoides de la región proximal del epidídimo no han completado su maduración, lo que podría ser en parte responsable de su baja capacidad fecundante (23). Patrizio y cols (24) evaluaron la tasa de fecundación y embarazo en función de la longitud de epidídimo permeable en hombres con CBAVD (aunque la microaspiración se llevó a cabo siempre en la cabeza del epidídimo), y observaron que los espermatozoides de varones que presentaban una mayor longitud de epidídimo funcional tenían un mayor porcentaje de fecundación en FIV, lo que confirma la importancia del túbulo epididimario en la maduración de los espermatozoides. No se aprecian, sin embargo, diferencias ultraestructurales en la morfología de espermatozoides procedentes de la rete testis, conos eferentes, cabeza del epidídimo y los presentes en el eyaculado (25).

La microinyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) ha supuesto el avance más significativo en el tratamiento de la infertilidad masculina en los últimos tiempos. La primera fecundación tras ICSI la obtuvieron Lanzendorf y cols (26), mientras que el grupo de Palermo obtuvo en 1992 el primer embarazo mediante esta técnica (27). Gracias al desarrollo de la ICSI es posible obtener ovocitos fecundados utilizando concentraciones extremadamente bajas de espermatozoides, así como muestras con muy baja movilidad (28), lo que permite utilizar espermatozoides de eyaculado, de epidídimo (tanto frescos como congelados) o de testículo (29, 30). Las tasas de fecundación y embarazo de la ICSI no parecen relacionadas con ninguno de los tres parámetros básicos del semen (número, movilidad y morfología espermáticos)

siempre que se utilicen espermatozoides móviles, ya que la movilidad, por muy reducida que sea, confirma que se trata de espermatozoides vivos (31). Algunos autores han observado que el uso de espermatozoides epididimarios congelados que presentaban una vitalidad inicial menor del 20% da lugar a tasas de fecundación extremadamente bajas (32).

El uso de la ICSI combinada con MESA se ha convertido en la opción terapéutica de elección para los pacientes que presentan obstrucción de los vasos deferentes (33, 34). Silber y cols (35) realizaron un estudio comparativo de las tasas de fecundación obtenidas tras fecundación *in vitro* convencional y tras microinyección de espermatozoides en pacientes que tuvieron que ser sometidos a microaspiración de espermatozoides epididimarios. Los resultados señalaban claramente a la ICSI como la técnica de elección, con tasas de fecundación del 47%, frente al 6,9% obtenido con la FIV convencional. El bajo número de espermatozoides que se requieren en cada ciclo de ICSI permite que los espermatozoides sobrantes de la microaspiración puedan ser criopreservados, pudiendo realizarse varios ciclos sin necesidad de recurrir a un nuevo proceso quirúrgico (36, 37). Además, la criopreservación de los espermatozoides permite separar en el tiempo ambos procedimientos pudiendo realizarse, si es necesario, en centros diferentes. Phillipson y cols (38) obtuvieron tasas de fecundación (76% vs 69%) e implantación embrionaria (17% vs 20%) similares utilizando espermatozoides epididimarios frescos y congelados, confirmando así los datos previos obtenidos por Tournaye y cols (59,4% vs 56,2% y 39,5% vs 26,3% respectivamente) para pacientes con obstrucción epididimaria de muy diversa etiología (39).

Los embriones que no son transferidos al útero pueden ser criopreservados para una transferencia posterior. Patrizio y cols (40) describieron los dos primeros embarazos conseguidos tras la transferencia de embriones criopreservados obtenidos mediante FIV convencional a partir de espermatozoides epididimarios.

EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

Las parejas que tienen un riesgo de tener niños afectados o portadores de la FQ cuentan con la posibilidad de un diagnóstico genético preimplantacional, que consiste en la biopsia de células de los embriones en desarrollo y el análisis molecular del gen de la en-

fermedad, de manera que sólo los embriones no afectados serán seleccionados para la transferencia (41, 42). Permite una detección más temprana de anomalías genéticas que el diagnóstico prenatal, evitando así un posible aborto terapéutico.

Hasta hace pocos años, las parejas que presentaban el riesgo de transmitir a su descendencia una anomalía genética tenían que someterse a un diagnóstico prenatal y, en caso de ser éste positivo, a la dura decisión de interrumpir el embarazo. Son varios los procedimientos que existen para valorar el estado del feto, siendo la amniocentesis (43) la técnica diagnóstica invasiva más común para detectar trastornos genéticos; este procedimiento ha de realizarse entre las semanas 14 y 16 de gestación, y presenta un riesgo de aborto del 0,5% (44). El muestreo de vellosidades coriónicas (MVC) también se utiliza para detectar anomalías cromosómicas; puede practicarse desde las 9 semanas de gestación, y la frecuencia de aborto es ligeramente superior a la de la amniocentesis, alrededor del 1% (45). Estas técnicas permiten establecer un diagnóstico con tiempo suficiente para poder interrumpir el embarazo de forma temprana si así se decide.

El DGP es una alternativa al diagnóstico prenatal (46), posible únicamente gracias al reciente desarrollo de las técnicas de fecundación *in vitro*. Supone el análisis genético de una o dos células (blastómeras) de embriones procedentes de fecundación *in vitro* que se encuentran en la fase de 6-8 células. Las células se obtienen mediante micromanipulación, y se ha comprobado que la biopsia embrionaria en este estadio de 6-8 células no es perjudicial para el desarrollo del embrión (47). Una vez obtenidas las células a analizar se realiza un estudio genético por amplificación específica de alelos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (48, 49). La PCR es capaz de amplificar millones de veces una sola copia de ADN, lo que permite el análisis genético de células individuales (50). Cuando los embriones obtenidos mediante técnicas de fecundación *in vitro* van a ser sometidos a DGP, la técnica de elección ha de ser la microinyección de espermatozoides (ICSI), independientemente de la calidad del semen; la FIV convencional puede dejar espermatozoides adheridos en el exterior del embrión (en la zona pelúcida o en el espacio perivitelino) que podrían contaminar la muestra de las blastómeras biopsiadas y dar lugar a un diagnóstico incorrecto.

La fibrosis quística presenta una gran heterogeneidad molecular. La mutación recesiva producida por la delección de tres pares de bases en el exón 10 (muta-

ción delta F508) es la responsable de aproximadamente el 55% de los casos de FQ. El resto de los casos pueden incluir más de 800 mutaciones diferentes y poco frecuentes, que presentan además una distribución geográfica específica (51, 52). Los pacientes (y embriones) afectados pueden ser homocigotos para la mutación delta F508, pero un porcentaje de casos serán homocigotos para otras mutaciones, o incluso heterocigotos para dos mutaciones diferentes, lo que se relaciona directamente con la mayor o menor severidad de los síntomas (53).

CONSEJO GENÉTICO

Dado que el riesgo de transmisión de la FQ es realmente elevado en las parejas portadoras, es esencial realizar un estudio genético siempre que se detecten los síntomas asociados a la enfermedad, acompañado de un diagnóstico genético preimplantacional y de consejo genético. El rastreo de anomalías cromosómicas, incluyendo el análisis de las mutaciones del gen CFTR (54), debería incluirse como aspecto fundamental en el estudio de todos los pacientes involucrados en ciclos de ICSI (55, 56, 57). Los varones con ausencia congénita de vasos deferentes requerirán un estudio genético de mutaciones relacionadas con la FQ, al igual que su pareja cuando se confirme que el varón es portador de la enfermedad, dado que aproximadamente 1/25 (4%) de la población general es portadora de una mutación en el brazo largo del cromosoma 7. Se podrá entonces facilitar a las parejas consejo genético sobre las posibles consecuencias para su descendencia, de manera que puedan realizar una decisión informada. En el caso de mujeres con fibrosis quística, además del rastreo genético en su pareja y del consejo genético, es esencial evaluar el riesgo materno en función de su estado de salud.

Es importante recordar que estas parejas no han tenido posibilidad de tener descendencia hasta hace pocos años, por lo que aún es pronto para conocer el potencial reproductivo de sus hijos. La transferencia únicamente de embriones sanos, seleccionados mediante DGP, debería limitar el riesgo exclusivamente al derivado de la ICSI. El uso de esta técnica ha suscitado ciertas dudas, dado que con ella se soslayan algunas de las barreras naturales de la fecundación, como son la penetración de la zona pelúcida por el espermatozoide y la fusión de éste con la membrana del ovocito. Sin embargo, el seguimiento realizado a niños nacidos tras ICSI ha demostrado que el riesgo de anomalías congénitas no superior al de la población general (58, 59).

CONCLUSIONES

La valoración del estado de salud de la paciente con fibrosis quística es esencial antes de que se produzca el embarazo, por las posibles complicaciones obstétricas. La barrera que supone el moco cervical más viscoso en estas pacientes puede superarse mediante la inseminación artificial intrauterina, con semen de su pareja o de un donante anónimo; si se trata de inseminación conyugal, es esencial descartar previamente que su pareja sea portador de la mutación. En el caso de que sea el varón el afectado de fibrosis quística, en la actualidad está plenamente contrastado que la azoospermia obstructiva que presentan puede ser tratada con éxito mediante una combinación de aspiración de espermatozoides del epidídimo e ICSI (60, 61), lo que proporciona unas excelentes perspectivas para este grupo de pacientes, tradicionalmente abocados a la inseminación artificial de sus parejas con semen de donante o a la adopción como únicos medios para tener hijos. El diagnóstico genético preimplantacional permitirá seleccionar únicamente los embriones sanos para su transferencia al útero (62), evitándose así la transmisión de la enfermedad a la descendencia. Es esencial realizar un estudio genético que incluya el análisis de la fibrosis quística a todos los pacientes con oligozoospermia severa o azoospermia, antes de su inclusión en un programa de ICSI. Por último, es imprescindible el consejo genético a los padres antes de la concepción, para que conozcan la probabilidad real de transmitir la enfermedad a sus hijos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Javier Dapena, de la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, por su gran ayuda en la corrección de este manuscrito. Al personal de la Sociedad Andaluza de Fibrosis Quística.

Federación Española contra la Fibrosis Quística.
96 346 14 14.
fq@retemail.es

BIBLIOGRAFÍA

1. **Kruyer, HC, Lench, N, Scrambler, P, Stanier, P.:** The application of molecular genetics to the study of the basic defect causing cystic fibrosis. *Prog. Clin. Biol. Res* 1987; 254, 181-190
2. **Williamson R, Wainwright B, Cooper C, Scrambler**

- P, Farrall M, Estivill X, Pederson P.:** The cystic fibrosis locus. *Enzyme* 1987; 38, 8-13
3. **Estivill X, Farrall M, Scrambler P, Bell GM, Hawley KM, Lench N, Bates GP, Kruyer HC, Frederick PA, Stanier, P.:** A candidate for the cystic fibrosis locus isolated by selection for methylation-free islands. *Nature* 1987; 326, 840-845
 4. **Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML.:** Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245, 1059-1065
 5. **Estivill X, Bates GP, Bell GM, Farral, M, Frederick PA, Hawle, KM, Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N.:** Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245, 1066-1073
 6. **Larson JE, Cohen JC.:** Cystic fibrosis revisited. *Mol. Genet. Metab* 2000, 71, 470-477
 7. **Kerem BS, Rommens JM, Buchanan D, Markiewicz D.:** Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 1989; 245, 1073-1080
 8. **Estivill X, Chillón M, Casals T, Bosch A, Morral N, Nunes V, Gasparini P, Seia A, Pignatti PF, Novelli G.:** Delta F508 gene deletion in cystic fibrosis in southern Europe. *Lancet* 1989; 2, 1404
 9. **Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon-Mataeva R, Macek M, Kalaydjieva L.:** The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat. Genet* 1994; 7, 169-175
 10. **Larriba S, Bassas L, Gimenez J, Ramos MD, Segura A, Nunes V, Estivill X, Casals T.:** Testicular CFTR splice variants in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum. Mol. Genet* 1998; 7, 1739-1743
 11. **Patrizio P, Salameh WA.:** Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mRNA in normal and pathological adult human epididymis. *J. Reprod. Fertil* 1998; 53, 261-270
 12. **Kim ED, Bischoff FZ, Lipshultz LI, Lamb DJ.:** Genetic concerns for the subfertile male in the era of ICSI. *Prenat. Diagn* 1998; 18, 1349-1365
 13. **Wong PYD.:** CFTR gene and male infertility. *Mol. Hum. Reprod* 1998; 4, 107-110
 14. **Van der Ven K, Messer L, Van der Ven H, Jeyendran RS, Ober C.:** Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. *Hum. Reprod* 1996; 11, 513-517
 15. **Pallares-Ruiz N, Carles S, Des Georges M, Guittard C, Arnal F, Humeau C, Claustres M.:** Complete mutational screening of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: Cystic fibrosis mutations are not involved in healthy men with reduced sperm quality. *Hum. Reprod* 1999; 14, 3035-3040
 16. **Cohen J, Edwards R, Fehilly C, Fishel S, Hewitt J, Purdy J, Rowland G, Steptoe P, Webster J.:** In vitro fertilization: A treatment for male infertility. *Fertil. Steril*, 1985; 43, 422-432
 17. **Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CW, Trounson AD, de Kretser DM.:** Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf* 1985, 2, 119-122
 18. **Silber SJ, Balmaceda J, Borrero C, Ord T, Asch R.:** Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: A new treatment for congenital absence of the vas deferens. *Fertil. Steril* 1988; 50, 525-528
 19. **Patrizio P, Ord T, Silber SJ, Asch RH.:** Cystic fibrosis mutations impair the fertilization rate of epididymal sperm from men with congenital absence of the vas deferens. *Hum. Reprod* 1993, 8, 1259-1263
 20. **Schlegel P, Berkeley A, Goldstein M, Cohen J, Alikani M, Adler A, Gilbert B, Rosenwaks Z.:** Epididymal micropuncture with in vitro fertilization and oocyte micromanipulation for the treatment of unreconstructable obstructive azoospermia. *Fertil. Steril* 1994, 61, 895-901
 21. **Silber SJ, Ord T, Balmaceda J, Patrizio P, Asch RH.:** Congenital absence of the vas deferens: The fertilizing capacity of human epididymal sperm. *N. Engl. J. Med* 1990; 323, 1788-1792
 22. **Silber SJ, Patrizio P, Asch RH.:** Quantitative evaluation of spermatogenesis by testicular histology in men with congenital absence of the vas deferens undergoing epididymal sperm aspiration. *Hum. Reprod* 1990; 5, 89-93
 23. **Moore HDM, Hartman TD, Pryor JP.:** Fertilizing capacity of human epididymal spermatozoa. *Int. J. Androl* 1983; 6, 310-318.
 24. **Patrizio P, Ord T, Silber SJ, Asch RH.:** Correlation between epididymal length and fertilization rate in men with congenital absence of the vas deferens. *Fertil. Steril* 1994;61, 265-268
 25. **Asch RH, Patrizio P, Silber SJ.:** Ultrastructure of human sperm in men with congenital absence of the vas deferens: Clinical implications. *Fertil. Steril* 1992; 58, 190-193
 26. **Lanzendor, SE, Maloney MK, Veek LL, Slusser J, Hodgen GD, Rozenwaks Z.:** A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil. Steril* 1988; 49, 835-842
 27. **Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.:** Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340, 17-18
 28. **Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey**

- P, Van Steirteghhe, AC.:** Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril* 1993; 59, 826-835
29. **Nagy Z, Liu J, Cecile J, Silber S, Devroey P, Van Steirteghem AC.:** Using ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril* 1995; 63, 808-815
 30. **Van Steirteghem A, Nagy P, Joris H, Janssenswillen C, Staessen C, Verheyen G, Camus M, Tournaye H, Devroey P.:** Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. *Hum. Reprod* 1998; 13, 134-142
 31. **Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC.:** The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum. Reprod* 1995, 10, 1123-1129
 32. **Holden CA, Fuscaldo GF, Jackson P, Cato A, Southwick GJ, Hauser R, Temple-Smith PD, McLachlan RI.:** Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril* 1997; 67, 81-87
 33. **Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem AC.:** Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: A new effective approach to infertility due to congenital absence of the vas deferens. *Fertil. Steril* 1994; 61, 1045-1051
 34. **McLachlan RI.:** The use of epididymal spermatozoa in assisted reproduction. *J. Reprod. Fertil* 1998; 53, 277-284
 35. **Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, Goday H, Devroey P, Van Steirteghem AC.:** Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum. Reprod* 1994, 9, 1705-1709
 36. **Devroey P, Silber S, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Van Steirteghem A.:** Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum. Reprod* 1995; 10, 903-906
 37. **Patrizio P.:** Cryopreservation of epididymal sperm. *Mol. Cell Endocrinol* 2000; 169, 11-14
 38. **Phillipson GT, Petrucco OM, Matthews CD.:** Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod* 2000; 15, 431-435
 39. **Tournaye H, Merdad T, Silber SJ, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A.:** No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum. Reprod* 1999; 14, 90-95
 40. **Patrizio P, Silbe, S, Ord T, Marelllo E, Balmaceda JP, Asch RH.:** Replacement of frozen embryos generated from epididymal spermatozoa: The first two pregnancies. *Hum. Reprod* 1992; 7, 652-653
 41. **Handyside AH, Lesko JG, Tarín JJ, Winsto, RM, Hughes MR.:** Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med* 1992; 327, 905-909
 42. **Goossens V, Sermon K, Lissens W, Vandervorst M, Vanderfaellie A, De Rijcke M, De Vos A, Henderix P, Van de Velde H, Van Steirteghem A, Liebaers I.:** Clinical application of preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat. Diagn* 2000, 20, 571-581
 43. **Wilson RD.:** How to perform genetic amniocentesis. *Journal SOGC* 1991; 13, 61
 44. **Goldberg JD.:** The role of genetic screening in the obstetric patient. En: Callen PW (ed.) *Ultrasonography in obstetric and gynecology*. 3^a ed. Philadelphia 1994
 45. **Thompson MW, McInnes RR, Willard HF.:** En: Saunders, WB (ed.) *Genetics in medicine*. 5^a ed. Philadelphia 1991
 46. **Handyside AH, Scriven PN, Ogilvie CM.:** The future of preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Reprod* 1998; 13, 249-255
 47. **Ray PF, Ao A, Taylor DM, Winston RM, Handyside AH.:** Assessment of the reliability of single blastomere analysis for preimplantation diagnosis of the delta F508 deletion causing cystic fibrosis in clinical practice. *Prenat. Diagn* 1998; 18, 1402-1412
 48. **Strom CM, Rechitsky S, Wolf G, Verlinsky Y.:** Reliability of polymerase chain reaction (PCR) analysis of single cells for preimplantation genetic diagnosis. *J. Assist. Reprod. Genet* 1994; 11, 55-62
 49. **Liu J, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I.:** Polymerase chain reaction analysis of the cystic fibrosis delta F508 mutation in human blastomeres following oocyte injection of a single sperm from a carrier. *Prenat. Diagn* 1993; 13, 873-880
 50. **Mullis KB, Faloan, F.:** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987, 155, 335-350
 51. **Estivill X, Bancells C, Ramos C.:** Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum. Mutat* 1997; 10, 135-154
 52. **Casals T, Ramos MD, Gimenez J, Larriba S, Nunes V, Estivill X.:** High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum. Genet* 1997; 101, 365-370
 53. **Mickle JE, Cutting GR.:** Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med. Clin. North Am* 2000; 84, 597-607

54. **Dequeker E, Cuppens H, Dodge J, Estivill X, Goossens M, Pignatt, PF, Scheffer H, Schwartz M, Tummler B, Cassiman JJ.:** Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis. European Concerted Action on Cystic Fibrosis. *Eur. J. Hum. Genet* 2000, 8, S2-24
55. **Pauer HU, Hinney B, Michelmann HW, Krasemann EW, Zoll B, Engel W.:** Relevance of genetic counselling in couples prior to intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod* 1997; 12, 1909-1912
56. **Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter Ch, Behre HM, Nieschlag E, Horst J.:** Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection- prevalence, sex distribution and reproductive relevance. *Hum. Reprod* 1998; 13, 576-582
57. **Jakubiczka S, Bettecken T, Stumm M, Nickel I, Musebeck J, Krebs P, Fischer C, Kleinstein J, Wieacker P.:** Frequency of CFTR gene mutations in males participating in an ICSI programme. *Hum. Reprod* 1999; 14, 1833-1834
58. **Van Steirteghem AC, Nagy P, Liu J, Joris H, Smits J, Camus M, Devroey P.:** Intracytoplasmic sperm injection- ICSI. *Reprod. Med. Rev* 1994; 3, 199-207
59. **Tarlatzis BC, Bili H.:** Intracytoplasmic sperm injection. Survey of world results. *Ann. NY Acad. Sci* 2000, USA 900, 336-344
60. **Palermo GD, Schlegel PN, Hariprashad JJ, Ergun B, Mielnik A, Zaninovic N, Veeck LL, Rosenwaks Z.:** Fertilization and pregnancy outcomes with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum. Reprod* 1999; 14, 741-748
61. **McCallum TJ, Milunsky JM, Cunningham DL, Harris DH, Maher TA, Oates RD.:** Fertility in men with cystic fibrosis: An update on current surgical practices and outcomes. *Chest* 2000; 118, 1059-1062
62. **Liu J, Lissens W, Silber SJ, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A.:** Birth after preimplantation diagnosis of the cystic fibrosis delta F508 mutation by polymerase chain reaction in human embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection with epididymal sperm. *JAMA* 1995; 272, 1858-1860