REVISTA IBEROAMERICANA DE
FERTILIDAD

Efectos a largo plazo de las técnicas de reproducción asistida sobre la descendencia

Long-term effects on offspring of assisted reproduction techniques

Muñoz-Quiles C, Pérez-Albalá S, Tarín 1 JJ

Departamento de Biología Animal, Facultad de Biología, Universidad de Valencia.
Valencia. España

Resumen

Objetivos: Analizar los efectos a largo plazo de las técnicas de reproducción asistida sobre la descendencia.

Resultados: La técnica de fecundación in vitro (FIV) y transferencia embrionaria (TE) se asocia con una elevada incidencia de embarazos múltiples que acarrean un elevado riesgo de partos prematuros, así como un aumento de la morbilidad y mortalidad en los recién nacidos. El riesgo de malformaciones congénitas y desarrollo psicomotor de niños nacidos tras FIV-TE no parece verse afectado, aunque existen estudios que demuestran lo contrario. La congelación/descongelación de gametos y embriones puede provocar daños en el DNA nuclear y mitocondrial. La aplicación de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) lleva asociada la aparición de anomalías en los cromosomas sexuales que podrían ser causadas por la descondensación atípica que tiene lugar en el núcleo del espermatozoide. Además la ICSI parece reducir la capacidad de formación de blastocistos. Parece ser que los niños de ICSI tienen el doble de probabilidad de presentar malformaciones congénitas mayores y casi un 50% por encima de presentar defectos menores cuando se comparan con niños de la población general. Otros estudios, sin embargo, no hallan tales diferencias. Parece ser que la biopsia embrionaria se asocia con una elevada tasa de embarazos múltiples y de complicaciones durante el embarazo y el parto. El peso al nacer, longitud, y presencia de malformaciones en niños nacidos tras biopsia embrionaria son similares a los obtenidos en ICSI.

Conclusiones: Aunque existen discrepancias entre estudios, las técnicas de reproducción asistida pueden en potencia dañar la salud, eficacia reproductiva y longevidad de la descendencia. Por ello, todo esfuerzo dedicado a mejorar estas técnicas y prevenir los posible daños en la descendencia debe ser uno de los principios prioritarios de los centros de reproducción/infertilidad.

Palabras Clave: Biopsia embrionaria. Congelación de gametos y embriones. Efectos a largo plazo. FI., ICSI.

Correspondecia: Juan J. Tarín
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Facultad de Medicina, Universidad de Valencia
Avda. Blasco Ibáñez 17
46010 Valencia.
E-mail: tarinjj@uv.es

Summary

Purpose: To analyze de long-term effects of assisted reproduction techniques on offspring

Results: The technique of in vitro fertilization (IVF) and embryo trasnfer (ET) is associated with a high incidence of multiple pregnancies, which in turn is related with increased risks of prematurity as well as morbidity and mortality in newborns. There are discrepancies in the literature as far as the psicomotor development of IVF-ET babies is concerned. The procedure of gamete/embryo freezing/thawing may damage mitochondrial and nuclear DNA. The technique of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is associated with anomalies in sexual chromosomes, which may be caused by the atypical decondensation exhibited by the sperm nucleus. Furthermore, it appears that ICSI decreases the potential of embryos to reach the blastocyst stage. Although there are discrepancies among studies, it has been reported that ICSI babies are twice as likely to have a major birth defect and nearly 50% more likely to have a minor defect than the general population. It appears that embryo biopsy is associated with a high rate of multiple pregnancies and obstetrics problems during pregnancy and labor. Body weight, length and congentital malformations in babies resulting from embryo biopsy are similar to ICSI babies.

Conclusionts: Although there are discrepancies among studies, it appears that assisted reproduction techniques may potentiallyt damage the health, reproductive fitness and longevity of offspring. For this reason, infertility/reproduction centres should double their's efforts to improve and prevent the potential detrimental effects of these techniques on offspring

Key words: Embryo biopsy. Gamete/embryo freesing. ICSI, IVF. Long-term effects.

INTRODUCCION

Las técnicas de reproducción asistida incluyen la maduración, fecundación y cultivo de embriones. Durante estos procesos, los ovocitos y embriones se ven expuestos a diferentes medios que contienen compuestos químicos diferentes a los que hay en el tracto reproductivo y a diferentes concentraciones, por ejemplo factores de crecimiento. Por ello, cabe esperar que el desarrollo de embarazos tras tratamientos con técnicas de reproducción asistida sea diferente al de embarazos producidos naturalmente. Las mujeres suelen ser mayores y con historias reproductivas atípicas, además sus gametos se exponen a una gran variedad de drogas y regímenes hormonales. Los embriones, a su vez, se nutren y desarrollan en condiciones potencialmente perjudiciales tales como la exposición a manipulaciones físicas y transferencia a un ambiente uterino preparado inapropiadamente (1). Las investigaciones en este campo han avanzado enormemente en los últimos años, y técnicas como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) o la biopsia embrionaria, están siendo utilizadas en muchos países. A pesar de haber transcurrido veinte años tras el nacimiento del primer niño probeta, todavía quedan muchas preguntas por responder sobre los efectos a largo plazo de estas técnicas sobre la descendencia.

Existen numerosas dificultades relacionadas con la formación de los gametos, el embrión y el feto capaces de provocar alteraciones no detectables en la morfología aparente. En base a alteraciones genéticas, bioquímicas o citológicas, su exteriorización puede darse una vez transcurrido cierto periodo de tiempo tras el nacimiento, a través de anomalías tales como un retraso en el crecimiento, retraso en la aparición de las señales del desarrollo post-natal temprano, alteraciones en las funciones endocrinas, cáncer, problemas reproductivos ó alteraciones comportamentales (2). Por todo ello, es necesario el estudio de los efectos a largo plazo que puede tener la aplicación de las técnicas de reproducción asistida sobre la descendencia. Este es precisamente el objetivo de la presente revisión de la literatura.

FECUNDACION IN VITRO

El éxito de la fecundación in vitro (FIV) depende en gran medida del número de embriones que se transfieren al útero. Por ello, en la mayoría de tratamientos de FIV se transfiere más de un embrión. Consecuentemente, al menos la mitad de niños nacidos tras FIV proceden de embarazos múltiples (3). Estos embarazos múltiples acarrean complicaciones fetales como son los partos prematuros, repaso en el

crecimiento intrauterino y muerte perinatal, pero los resultados obtenidos en varios esturios de embarazos únicos tras FIV también parecen ser significativos. Olivennes y su equipo (4), en un estudio retrospectivo compararon, 162 embarazos únicos con FIV con 263 embarazos resultantes de ciclos estimulados (sin FIV) y con 5096 embarazos naturales. No encontraron diferencias significativas entre los dos primeros grupos en cuanto a dichas complicaciones fetales. Los resultados indicaron que el efecto adverso es más común para embarazos tras estimulación ovárica (con ó sin FIV) comparado con los embarazos naturales. De este modo, el riesgo no parece estar unido al método de FIV en sí mismo, si no que parece ser un factor común en estas dos poblaciones, por ejemplo, características de la población, el estado de infertilidad y/ó la estimulación ovárica. Tan y su equipo (5) detectaron un incremento de sangrías vaginales, hipertensión requiriendo hospitalización, e incluso en el paso de embarazos únicos, un aumento en la incidencia de partos prematuros, retrasos en el crecimiento intrauterino y placenta previa en el caso de embarazos resultantes de FIV en comparación con concepciones naturales. Doyle y colaboradores (6) investigaron los posibles factores de riesgo de estas complicaciones en nacimientos únicos tras FIV. Mediante un análisis de regresión múltiple concluyeron que (i) la hipertensión durante el embarazo es un factor de riesgo no relacionado con los partos prematuros, bajo peso al nacer y pequeño tamaño corporal para su edad gestacional; (ii) el sangrado durante el embarazo no guarda relación con los partos prematuros y (iii) el número de embriones transferidos y el tipo de infertilidad no se relacionan con bajo peso en el nacimiento.

Mujeres sometidas a FIV y transferencia intratubárica de gametos (GIFT) presentan un mayor riesgo de parir niños pequeños (SGA) o muy pequeños (VSGA) para su edad gestacional y de parir prematuramente, incluso tras corregir por la edad, el tipo de parto y el carácter de prematuro, que el esperado en la población obstétricamente normal (7). Varias publicaciones han mostrado que la infertilidad per se está asociada a una disminución del peso de los recién nacidos incluso cuando los embarazos se dan espontáneamente (8-11). Wang y colaboradores (7) postularon que el proceso de FIV/GIFT no causa la elevada incidencia de SGA/VSGA, sino que el elevado riesgo de parir un niño SGA/VSGA por mujeres con infertilidad inexplicada indica que debe ser causado por factores intrínsecos de este subgrupo.

Draper y colaboradores (12), en un estudio de embarazos FIV o GIFT detectaron de nuevo un elevado riesgo de embarazos múltiples, partos prematuros, bajo peso al nacer y muerte petinatal, y concluyeron que en casos de infertilidad no tratada, la explicación a estos efectos estaría más relacionada con la enfermedad que con el tratamiento. Los tratamientos de infertilidad se asocian con morbilidad neonatal, y muchos de sus impactos parecen estar mediados por la prematuridad y la multiplicidad (13).

Estudios recientes han demostrado que el nacimiento de gemelos monozigóticos como resultado de la aplicación de técnicas de reproducción asistida es más frecuente que tras embarazos naturales (14-16). Los pacientes con edad superior a 35 años que han recurrido a técnicas de fecundación asistida con la práctica de una apertura artificial en la zona pelúcida para facilitar la salida del blastocisto poseen un riesgo superior de tener gemelos monozigóticos (16).

Uno de los principales problemas de FIV encontrados hasta el momento es la elevada incidencia de partos prematuros. El momento del parto determina la duración del periodo de vida fetal intrauterina, requisito para alcanzar la adaptación adecuada al medio externo. La inmadurez, debida a un corto embarazo, determina el aumento en la mortalidad y morbilidad asociadas con los partos prematuros. Las principales características de la descendencia inmadura son la presencia de secuelas neurológicas importantes tales como parálisis cerebral, retinopatía y pérdida de oído, habilidades neurofisiológicas reducidas que conducen a un rendimiento académico deficiente y el deterioro de varios aspectos del estato de salud (17).

Barker (18), basándose en un exhaustivo análisis de historiales médicos de la década de los 80, encontró relaciones sorprendentes entre medidas antropométricas tales como el peso al nacer, o tras 1 año de vida y la susceptibilidad a ciertos desordenes en el adulto, incluyendo la enfermedad coronaria del corazón, apoplejia, hipertensión y diabetes no dependiente de insulina (18). La situación se ha hecho más compleja desde que han sido asociados diferentes factores de riesgo a diferentes modelos de crecimiento temprano; la presión sanguínea del adulto está inversamente relacionada con el peso al nacer, pero no se asocia con el peso al año de vida (19).

Mientras que algunos estudios han detectado una alta incidencia de malformaciones congénitas presentes en el nacimiento tras FIV en comparación con embarazos naturales (20-23) otros no hallan tales diferencias (24-28). Está todavía pendiente de estudio si estos efectos son debidos al procedimiento per se, un factor materno/paterno o una combinación de ambos. Berg y su equipo (29) observaron malformaciones mayores y menores en un 5,4% de todos los niños

nacidos a partir de FIV, y las tasas de defectos en el tubo neural y atresia esofagueal fueron mayores que en el grupo control. No hubo incremento en cáncer en el grupo de FIV. Estos autores concluyeron que son la elevada frecuencia de nacimientos múltiples y las características maternas los principales factores que conducen a estos resultados más que la técnica de la FIV en sí misma. Además la tasa de malformaciones no difirió entre nacimientos tras FIV convencional, ICSI ó embriones congelados y descongelados.

El envejecimiento de los gametos antes de producirse la fecundación puede afectar a determinados procesos moleculares, bioquímicos y celulares de dichos gametos que perjudicarían tanto el desarrollo embrionario pre y post-implantatorio como la vida posterior de la descendencia (30). En concreto el envejecimiento pre y post-ovulatorio de los ovocitos se asocia a (i) disminución del potencial de fecundación de los ovocitos y del potencial de desarrollo embrionario pre- y/o post-implantatorio; (ii) anomalías congénitas; (iii) desviación de la proporción entre sexos a favor del sexo masculino; (iv) retraso en la integración sensorimotora durante el desarrollo previo al destete; (v) alteraciones del comportamiento y/o dificultades de aprendizaje en la descendencia; (vi) algunas enfermedades constitucionales como la diabetes mellitus, esquizofrenia y enfermedad de Alezheimer; (vii) disminución de la fertilidad; y (viii) menos esperanza de vida en la descendencia. Del mismo modo, el envejecimiento de los espermatozoides, ya sea en el tracto reproductivo masculino tras ligadura epididimal, en el tracto reproductivo femenino o bajo condiciones in vitro se asocia a una disminución de la motilidad de los espermatozoides, potencial de fecundación y posterior desarrollo pre y/o post-implantatorio.

SINDROME DEL LECHAL GRANDE

Desde hace unos 10 años se sabe que la transferencia de embriones de oveja y ganado vacuno puede conducir a la obtención de descendencia anormal (31). Estas anomalías incluyen un elevado peso al nacer (32-33), fisiología aberrante (34) y desarrollo anormal de órganos y esqueleto (35-40). El nacimiento de esta descendencia está asociado con una elevada mortalidad pre y perinatal (32) y anomalías en la placenta (39, 41, 42). A pesar del gran incremento del peso al nacer, existen evidencias, aunque limitadas, que indican que pesos corporales de los individuos adultos que fueron corderos y terneros de gran tamaño no difiere significativamente de los animales control (43-44).

Holm y su equipo (45) demostraron que un ovocito madurado y transferido inmediatamente tras FIV podría producir descendencia con un desarrollo comprometido, aunque no fue posible separar los efectos de la maduración y los de la fecundación. La calidad de un ovocito viene determinada por varios factores, uno de los cuales es la nutrición de la donante de ovocitos. Algunas evidencias indican que la alimentación con una gran cantidad de nitrógeno no proteico (urea) de una oveja durante 21 días antes del apareamiento y durante el embarazo puede producir corderos de gran tamaño (46), pero no es posible determinar el efecto real del ovocito sobre este síndrome.

Crosier y su equipo (47) en su estudio utilizaron análisis morfométricos para cuantificar la ultraestructura de mórulas compactas bovinas producidas in vivo e in vitro utilizando tres medios de cultivo diferentes. Según sus resultados, la morfología de embriones cultivados en medio libre de suero, no fue comparable con la de embriones producidos in vivo, lo que contradice los resultados obtenidos en estudios anteriores (48). Las tasas de embarazo tras la transferencia de las mórulas compactas producidas in vitro fueron inferiores a las obtenidas tras la transferencia de mórulas compactas producidas in vivo. Además el resultado del cultivo in vitro fueron mórulas compactas con mayor cantidad de lípidos y con una disminución en la densidad de mitocondrias maduras. Las mórulas compactadas cultivadas en medio complementado con suero presentaron el mayor grado de desviación morfológica, con una disminución en la densidad mitocondrial tanto total como de mitocondrias maduras, un aumento en la densidad de vacuolas, y una disminución en la relación núcleo:citoplasma. Los datos obtenidos en este estudio muestran las dificultades en la obtención de mórulas compactadas bovinas mediante cultivo in vitro. El oviducto proporciona un medio único para la fecundación y primeras divisiones embrionarias y es muy difícil intentar mimetizar sus propiedades físico-químicas in vitro. No es de extrañar que el cultivo in vitro de embriones de vacas y ovejas vaya asociado con una serie de anomalías en el desarrollo incluyendo tasas aberrantes de desarrollo, degeneración mitocondrial, fragmentación citoplásmica, elevado contenido lipídico en el citoplasma, diferenciación del linaje celular alterada, y metabolismo y expresión genética anormales (49). Sin embargo ninguna de estas anomalías ha sido relacionada directamente con efectos a largo plazo. En el ganado, la aparición de fetos con un crecimiento

anormal y problemas asociados con él se intensifica cuando el periodo de cultivo incluye el momento de la activación del genoma embrionario (32) y cuando el medio de cultivo contiene suero (33). No se sabe si el causante es el propio suero o la descomposición de un producto del suero o el metabolismo del embrión. Elevadas concentraciones de iones amonio en el medio de cultivo pueden causar retraso fetal y exencefalía en ratones (50), y peso fetal incrementado en la oveja (39, 51). Sin embargo, tras la transferencia de embriones cultivados en medio sin suero también puede ocurrir un desarrollo aberrante (46-51), lo que implica la existencia de otros agentes físicos o químicos.

CONGELACION/DESCONGELACION DE GAMETOS Y EMBRIONES

El método de la superovulación utilizado en muchos tratamientos de FIV suele producir un elevado número de ovocitos susceptibles de ser fecundados. De modo que si se producen embriones en exceso, estos pueden ser congelados y posteriormente descongelados en ciclos sucesivos. La congelación-descongelación envuelve cambios celulares y bioquímicos dramáticos, como son la inactivación de enzimas, trastomos iónicos, o el ataque de radicales libres, que pueden tener efectos en la descendencia.

Congelación/descongelación de espermatozoides

Se trata de una técnica utilizada desde hace unos 50 años, sobretodo en el campo de la veterinaria. Los resultados clínicos obtenidos hasta el momento no revelan anomalías aparentes en la descendencia. Los miles de niños nacidos a partir de espermatozoides congelados presentan una constitución aparentemente normal (2). Resultados experimentales han mostrado que la crioconservación de espermatozoides humanos produce cambios en la metilación del DNA (52) y en la estabilidad de la cromatina (53). También aparece una alteración en el transporte de calcio a través de la membrana celular (54). Un incremento en los niveles de calcio intracelular puede aumentar la frecuencia de rotura del DNA nuclear a través de la activación de nucleasas (55) y la producción de radicales libres, cuyo potencial dañino es conocido, a través de la peroxidación lipídica (56-57). Estos cambios en el metabolismo del calcio pueden explicar la disminución de la motilidad de algunos espermatozoides congelados y descongelados aparentemente normales.

A pesar de estos resultados, dada la producción de ratones normales a partir de esperma crioconservado, muchos autores concluyen que la motilidad y la integridad de la membrana plasmática no son esenciales para la producción de descendencia viva cuando el núcleo de un espermatozoide es inyectado en un ovocito (58). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el único criterio utilizado para calificar como normal a la descendencia resultante es la ausencia de malformaciones en el nacimiento. Los efectos a largo plazo nunca son considerados.

Congelación/descongelación de ovocitos

La crioconservación de ovocitos no fecundados parece ser una alternativa muy atractiva para resolver los problemas que acarrea la congelación y descongelación de embriones humanos. Sin embargo, hay que resaltar que ha resultado ser muy difícil llevarlo a cabo en ratones y conejos (59-61) y sólo se ha obtenido algún resultado positivo en humanos (62-65).

La explicación a estas dificultades no se conoce con claridad, pero se ha demostrado que la congelación perjudica la organización normal del huso meiósico y mitósico en ovocitos de ratón (59, 66-68). También contribuye a una disminución en la tasa de fecundación (59, 69, 70), un aumento de las anomalías morfológicas en los ovocitos y un aumento de embriones poliploides, particularmente digénicos, debido principalmente a la retención del segundo corpúsculo polar (61, 70, 71). Auroux y su equipo (2) han demostrado que los embriones de ratones obtenidos a partir de ovocitos congelados u ovocitos expuestos a manipulaciones pre-congelación presentan una mayor frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (72), lo que sugiere que el ciclo completo de crioconservación debe alteral al ovocito y más particularmente, inducir daño en el DNA.

Congelación/descongelación de embriones

La congelación de embriones es una práctica común en varias especies incluyendo los humanos. Esta técnica puede ser letal para algunos embriones, pero no parece tener efectos posteriores en los superpivientes. Un primer estudio realizado en humanos mostró que los niveles de gonadotrofina coriónica humana y 17 ß-estradiol fueron, en la fase de preimplantación, más altos en el caso de los embriones frescos que en el caso de embriones que habían sido crioconservados. Esta diferencia puede ser explicada por el mayor número de embriones frescos transferidos o por el hecho de que el número de blastómeros y su actividad metabólica podría disminuir tras la congelación y descongelación (73).

Duliost y sus colaboradores (74), en un estudio a largo plazo incluyendo el desarrollo previo al destete, la etapa adulta y la senescente, hallaron diferencias significativas en características morfofisiológicas, sensorimotoras y comportamentales entre dos cepas endogámicas de ratones cuyos embriones habían sido crioconservados y ratones control. Los cambios observados en el peso corporal, desarrollo previo al destete, capacidad de aprendizaje y morfometría de la mandíbula, variaban en función de la cepa, el peso y la edad. Otros estudios realizados sugieren la posibilidad de efectos perjudiciales tras la implantación, puestos en evidencia por el aumento en el porcentaje de pérdidas post-implantación (75-78) o por una reducción de los pesos fetales (79).

Se han publicado varios estudios de niños nacidos a partir de embriones que habían sido congelados y descongelados (80-83). Stutcliffe y su equipo (81) estudiaron el desarrollo perinatal de 91 niños procedentes de embriones crioconservados. Estos niños se compararon con 83 niños control concebidos naturalmente. El riesgo de tener malformaciones congénitas fue 31,9% vs 21,7% en el grupo control para malformaciones menores y 3,3% vs 2,4% en el grupo control para malformaciones congénitas mayores. Las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas. Olivennes y sus colaboradores (80) estudiaron el desarrollo perinatal y el seguimiento del desarrollo psicomotor desde la edad de 1 a 9 años de un grupo de 82 niños nacidos tras crioconservación de los embriones. No utilizaron ningún grupo control, las tasas de nacimientos prematuros únicos y de bajo peso al nacer fueron de 14,7% y 9,3%, respectivamente. La tasa de malformaciones congénitas fue del 3,4%. No encontraron patología en el desarrollo psicomotor.

Wennerholm y su equipo (82) compararon 270 niños nacidos tras crioconservación con el mismo número de niños control tras la transferencia de embriones frescos procedentes de fecundación espontánea. No se encontraron diferencias en las tasas de nacimientos prematuros o de bajo peso al nacer, ni en la tasa de malformaciones. En un estudio posterior del mismo grupo (83), no se hallaron diferencias entre 255 niños nacidos a partir de embriones crioconservados, 255 nacidos tras FIV con embriones frescos y 252 niños de embarazos espontáneos en el desarrollo ni en la frecuencia de enfermedades crónicas durante los primeros 18 meses. Obviamente, el número de estudios sobre los efectos de la congelación-descongelación de embriones humanos es limitado, el número de sujetos por estudio es bastante bajo y los datos y seguimientos son escasos. Hasta el momento, no existe evidencia, a partir de datos de humanos, de que la crioconservación produzca riesgos para los fetos, pero no cabe duda de que debería investigarse más al respecto.

La congelación durante largos periodos de tiempo podría permitir a factores mutágenos, como las radiaciones naturales, acumular sus efectos, aunque no permitiría la actuación de los sistemas de reparación, pudiéndose originar así daños irreversibles (52). Los resultados obtenidos hasta el momento sobre los efectos a largo plazo de la crioconservación sugieren que, tras estos daños inmediatos, la congelación de embriones podría no ser completamente neutra (74, 84).

INYECCION INTRACITOPLASMATICA DE ESPERMATOZOIDES

Muchas parejas con un factor de infertilidad masculina grave pueden ser tratadas con ICSI, requiriendo únicamente un espermatozoide con el genoma y centrosoma activos para la fecundación de cada ovocito. La ICSI puede ser utilizada también con espermatozoides del epidídimo o de los testículos cuando hay una obstrucción en el conducto excretor. Bonduelle y su equipo (85) realizaron un seguimiento de 1987 niños de ICSI y no encontraron ninguna incidencia alta de malformaciones específicas. La única malformación que se encontró en exceso en niños nacidos tras ICSI fueron las hipospadias, que parecen estar relacionadas con la infertilidad paterna (86). Kurinczuk y su equipo (87) estudiaron los defectos de los niños nacidos tras ICSI. Clasificaron estos defectos utilizando el sistema estándar de clasificación, y compararon sus resultados con los obtenidos en el oeste de Australia que fueron clasificados con el mismo sistema. Encontraron que los niños nacidos tras ICSI tenían el doble de probabilidad de tener defectos mayores de nacimiento que niños de la población general, definiendo como tales aquellas malformaciones que generalmente causan deterioros funcionales y que requieren intervención quirúrgica, y cerca del 50% más de probabilidad de tener defectos menores, siendo estas las malformaciones restantes. Pieters y sus colaboradores (88) describieron un paciente tratado con ICSI con espermatozoides anormales. Demostraron que en ese paciente, la espermatogénesis perturbada estaba asociada con anomalías cromosómicas y meiosis anormal. Tras varios estudios concluyeron que las anomalías genotípicas/fenotípicas simultáneamente en pacientes de ICSI son más frecuentes de lo esperado.

En 1999, Hewitson y su equipo (89) demostraron

que la posición del segundo huso meiósico es variable en relación con el primer corpúsculo polar, en consecuencia, la señalización de la microinyección es imprecisa y potencialmente letal. Según sus resultados, la ICSI resulta en una descondensación anormal del pronúcleo masculino que se inicia en la región basal. Las proteínas de membrana asociadas a vesícula (VAMP) se sitúan alrededor del pronúcleo masculino que se está formando, separando la región descondensada de la condensada, y persisten hasta que el pronúcleo está totalmente formado. El DNA permanece muy condensado en la región anterior, rodeado del acrosoma intacto y la teca perinuclear, estructuras que normalmente desaparecen durante la fecundación. Se requirió un remodelamiento del pronúcleo masculino en los ovocitos inyectados antes de la replicación del genoma parental, indicando un único punto de control en la transición G1-S durante la interfase cigótica (el primer ciclo celular). Terada y su equipo (90) hallaron también esta descondensación atípica tras ICSI en el núcleo del espermatozoide en monos rhesus, y sugirieron que la presencia de los cromosomas sexuales en dicha región del núcleo del espermatozoide humano en proceso de descondensación tras ICSI podría explicar el aumento en la tasa de anomalías en los cromosomas sexuales en niños concebidos por este método. La entrada en la fase S se ve retrasada debido a la incompleta descondensación de la región apical. Según los resultados obtenidos en su estudio, concluyeron que la descondensación atípica y el retraso en la entrada en la fase S deben ser la mayor causa del aumento en la formación de novo de anomalías en el cromosoma que no son heredadas del padre.

Por otro lado, en hombres oligo y azoospérmicos se han encontrado microdeleciones en la región AZFc del cromosoma Y. Estas mutaciones eran genéticamente letales antes de la aparición de la ICSI, pero actualmente se pueden transmitir a generaciones sucesivas vía ICSI. Kremer y su equipo (91) desarrollaron el modelo matemático para mutaciones ligadas al cromosoma Y con dos variables: aptitud física y frecuencia de mutaciones. Concluyeron que el aumento en la frecuencia de hombres con microdeleciones en la región AZFc en futuras generaciones se verá limitado puesto que la aptitud física de esos hombres quedará limitada. En 1995, Meschede (92) postulaba que la introducción de la ICSI dentro de la medicina reproductiva podría tener una consecuencia paradójica: "la subfertilidad se podría convertir en una condición hereditaria". En un estudio reciente (93, 94) Metrschede y su equipo demostraron que los factores genéticos juegan un papel importante en la patogénesis de la infertilidad humana. En concreto, la infertilidad masculina parece tener un mayor componente familiar y debería ser contemplado como una condición potencialmente hereditaria incluso en ausencia de anomalías genéticas demostrables citogenética o molecularmente. Evidencias indirectas sugieren que una mayoría de las lesiones genéticas evaden su detección con protocolos de laboratorio clínicos corrientes.

Griffiths y sus colaboradores (95), demostraron que el desarrollo embrionario in vitro se ve comprometido por el procedimiento de la ICSI. Las tasas de implantación alcanzadas con ICSI fueron equivalentes a las alcanzadas mediante el FIV convencional, pero encontraron que el 20% de los embriones de ICSI y el 50% de los embriones de FIV formaron blastocistos, demostrando así que el procedimiento de la ICSI contribuye a la reducción de la capacidad de formación de blastocistos in vitro. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Menezo et al. (96) y Shoukir et al. (97). En la ICSI, los espermatozoides son seleccionados en función de sus características morfológicas y de su motilidad. Estas características probablemente no están asociadas con el posterior desarrollo de los embriones resultantes, por lo que muchas veces, el espermatozoide inyectado puede carecer de un buen potencial de desarrollo. La ICSI no subsana los defectos mayores de los espermatozoides.

Respecto a los efectos a largo plazo de la ICSI, los estudios dirigidos por Bowen y sus colaboradores (98) en Australia y por Bonduelle y colaboradores (99) en Bruselas fueron los primeros enfocados principalmente sobre este aspecto. Bowen y su equipo (98) compararon el estado médico y el grado de desarrollo de 89 niños de un año de edad concebidos por ICSI con 80 niños concebidos naturalmente y con 84 niños concebidos con técnicas convencionales de FIV. Estos autores utilizaron la segunda edición de las escalas de Bayley del desarrollo de niños (BSIDII), de las que se derivan el índice de desallollo mental (MDI) y el índice de desallollo psicomotor (PDI). El MDI de los niños ICSI resultó ser significativamente más bajo que el de los niños control. El desallollo de los niños fue más retrasado que el de las niñas. Sin embargo estos resultados se deben interpretar con cautela; las normas de BSIDII fueron estandarizadas sólo para la población americana y podría haber dudas sobre su aplicabilidad en la población australiana. Además había diferencias demográficas entre los padres de los tres grupos (ocupación de los padres de los niños de ICSI, educación de las madres, país de origen y lenguaje hablado en casa) que también podrían afectar los resultados (85).

Estos descubrimientos apoyan la necesidad de progresar en el seguimiento del desarrollo de niños concebidos por ICSI para comprobar si presentan riesgo de deterioro intelectual o dificultades de aplendizaje en la edad escolar.

Bonduelle y su equipo (99) estudiaron el desarrollo mental de 201 niños ICSI y 131 niños FIV a la edad de 2 años. Obtuvieron un MDI excepcionalmente alto en unos 112 niños con edades comprendidas entre 22 y 26 meses. Estos resultados también hacen cuestionarse los antecedentes parentales de la muestra o los métodos utilizados. Las diferencias entre los grupos están de acuerdo con las tendencias encontradas por Bowen y colaboradores, en que los varones y niños ICSI tienen índices nás bajos que las niñas y los niños de FIV, respectivanente. Los resultados del estudio de Meschede (93, 94) concuerdan con otros estudios de seguimiento pediátrico (100-104) los cuales encontraron tasas de malformaciones normales y desarrollo psicomotor normal en niños nacidos tras ICSI.

BIOPSIA EMBRIONARIA

El diagnóstico preimplantatorio permite la selección y la transferencia de embriones que no presenten defectos genéticos (105). Muchos defectos genéticos son diagnosticados actualmente a través del análisis del DNA gracias al establecimiento de las bases moleculares de un gran número de enfermedades hereditarias. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite amplificar rápidamente fragmentos de DNA a partir de un pequeño número de células (106). Tarín y Handyside (107) realizaron un estudio para encontrar el estado embrionario óptimo en el que practicar la biopsia, así como el máximo número de células que deberían ser extirpadas sin perjudicar el desarrollo posterior in vivo e in vitro. En ese estudio, se concluyó que la biopsia de una cuarta parte del embrión en el día tercero post-inseminación sería el estado óptimo para llevar a cabo el diagnóstico preimplantatorio. Gentry y su equipo (108) postularon que aunque la extracción de células en el estado de 4 a 8 células no perjudica el desarrollo in vivo o in vitro, la mayor disponibilidad de células del trofoectodermo de blastocistos minimiza los problemas asociados con el número de células. Los resultados de su estudio indicaron que la biopsia en blastocistos no perjudica la tasa de nacimientos, el peso al nacer o el crecimiento hasta el destete en ratones. No encontraron anomalías macroscópicas en el nacimiento ni en el periodo previo al destete. Se estudiaron sesenta descendientes durante seis meses tras el destete; no observaron anomalías macroscópicas. La capacidad reproductiva de la descendencia derivada de los blastocistos a los que se les había practicado la biopsia no pareció verse perjudicada, aunque el tamaño de la muestra fue limitado. Al igual que en la primera generación, no se hallaron anomalías macroscópicas en el nacimiento y en el desarrollo previo al destete en la segunda generación. El Consorcio de la ESHRE de Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD) ha publicado recientemente una puesta al día de los resultados de la técnica de PGD (109). El estudio recoge datos sobre 163 embarazos y 224 sacos embrionarios desde 1993 hasta mayo del 2000. Los resultados muestran que durante el primer trimestre se produjo la pérdida de 32 de los 224 sacos embrionarios. Durante el segundo trimestre tuvieron lugar 7 abortos y 5 embarazos triples y 1 cuádruple que se redujeron a embarazos únicos. Finalmente, se produjeron 123 partos (85 únicos, 37 dobles y 1 triple). En cuanto a las complicaciones sufridas durante el embarazo, el estudio contó con la información completa de 95 embarazos, de los cuales, 64 transcurrieron sin tales complicaciones y 31 embarazos sufrieron complicaciones. Las principales complicaciones fueron partos prematuros y ruptura prematura de membranas, de las cuales una gran proporción se produjo en embarazos múltiples (el 22% de las complicaciones se dio en embarazos únicos y el 32% en embarazos gemelares). El estudio muestra también datos recogidos sobre el nacimiento de 162 niños. La proporción entre sexos está muy desviada hacia el sexo femenino debido al elevado número de niñas resultantes de la aplicación del diagnóstico preimplantatorio de enfermedades asociadas al cromosoma X. El peso medio de los 145 nacimientos registrados fue de 2824 g, con una media de 3167 g para 81 niños únicos y 2344 g para 64 gemelos. La media de la longitud en el nacimiento fue de 47,9 cm, y la media de la circunferencia de la cabeza fue de 33,2 cm. Las medias Apgar fueron buenas en 78 de 82 niños y malas en 4 niños, tres de los cuales mostraron una buena evolución posterior y el cuarto, un niño que nació muy prematuramente, murió. Sobre la presencia o ausencia de malformaciones, dispusieron de la información sobre 130 niños de los cuales, 121 no mostraron malformaciones. Siete niños mostraron malformaciones no letales, desde la mancha oscura en la región lumbar característica de la raza mongólica hasta los pies zambos o contrahechos en general (Talipes equinovarus), y dos niños murieron debido a malformaciones letales (exencefalía y quilotórax). Según sus resultados, el peso al nacer, longitud, y presencia de malformaciones en niños nacidos tras biopsia embrionaria son muy similares a los obteni-

dos en niños nacidos tras ICSI. A pesar de este análisis riguroso realizado por el Consorcio de la ESHRE, no cabe la menor duda de la necesidad de un mayor estudio sobre la existencia de consecuencias adversas a largo plazo.

RESUMEN-CONCLUSION

Según muestra la presente revisión, uno de los principales problemas de las técnicas de FIV-TE es la elevada incidencia de embarazos múltiples que acarrean un elevado riesgo de partos prematuros, así como un aumento de la morbilidad y mortalidad en los recién nacidos. Tanto los embarazos de FIV-TE únicos como gemelares parecen tener un elevado riesgo de partos prematuros y bajos pesos al nacer al compararlos con embarazos únicos y gemelares control. Algunos estudios han detectado una alta incidencia de malformaciones congénitas presentes en el nacimiento tras FIV en comparación con embarazos naturales, mientras que otros autores no hallan tales diferencias. Está todavía pendiente de estudio si estos efectos son debidos al procedimiento per se, un factor materno/paterno o una combinación de ambos.

Parece ser que el cultivo in vitro de embriones de oveja y de ganado vacuno se asocia con una serie de anomalías en el desarrollo tales como tasas aberrantes de desarrollo, degeneración mitocondrial, fragmentación citoplásmica, elevado contenido lipídico en el citoplasma y metabolismo y expresión genética anormales. Además se sabe que la aparición de fetos con crecimiento anormal y problemas asociados con él se intensifica cuando el periodo de cultivo incluye el momento de la activación del genoma embrionario y sobre todo cuando el medio de cultivo contiene suero. También puede ocurrir un desarrollo aberrante tras la transferencia de embriones cultivados en medio sin suero, lo que implica la existencia de otros agentes físicos o químicos. Afortunadamente, este síndrome no se ha observado en humanos.

Se ha demostrado que la congelación/descongelación de espermatozoides produce cambios en la metilación del DNA y en la estabilidad de la cromatina, alteraciones en el transporte de calcio a través de la membrana celular que lleva a un aumento de los niveles de calcio intracelular y con ello, a un aumento de frecuencia de rotura del DNA nuclear por nucleasas y producción de radicales libres a través de la peroxidación lipídica. La congelación/descongelación de ovocitos perjudica la organización normal del huso meiósico y mitósico, disminuye la tasa de fecundación, aumenta el número de anomalías morfológicas de los ovocitos y aumenta el número de embriones poliploides. Por otro lado, la congelación/descongelación de embriones, no parece afectar las tasas de nacimientos prematuros, de malformaciones ni de bajos pesos al nacer, aunque el número de estudios y el número de sujetos por estudio es bastante bajo.

En cuanto a la biopsia embrionaria, parece que el blastocisto es el estado óptimo para llevar a cabo dicha práctica minimizando así los posible efectos sobre la implantación. Los resultados obtenidos hasta la actualidad con la biopsia de embriones en fases previas a la compactación indican una elevada tasa de embarazos múltiples y de complicaciones durante el embarazo y el parto. El peso al nacer, longitud, y presencia de malformaciones en niños nacidos tras biopsia embrionaria son muy similares a los obtenidos en niños nacidos tras ICSI.

La aplicación de la ICSI lleva asociada la aparición de novo de anomalías en los cromosomas sexuales que podrían ser causadas por la descondensación atípica que tiene lugar en el núcleo del espermatozoide. Además la ICSI parece reducir la capacidad de formación de blastocistos. En cuanto a malformaciones en el nacimiento existen estudios que demuestran que la probabilidad de presentar malformaciones congénitas es el doble para niños nacidos tras ICSI en comparación con niños concebidos mediante FIV convencional, mientras que otros estudios no hallan tales diferencias. Según lo expuesto en la presente revisión, se desprende que, aunque existen discrepancias entre estudios, las técnicas de reproducción asistida pueden en potencia dañar la salud, eficacia reproductiva y longevidad de la descendencia. Por ello, todo esfuerzo dedicado a mejorar estas técnicas y prevenir los posible daños en la descendencia debe ser uno de los principios prioritarios de los centros de reproducción/infertilidad.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido realizado gracias a las ayudas GV99-138-1-04 de la Conselleria de Cultura, Educació i Ciencia, Generalitat Valenciana; FIS 00/0668, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo; y lFD97-1035-C02-01, CICYT, Ministerio de Educación y Cultura y Unión Europea.

BIBLIOGAFÍA

1. **McFaul PB, Patel N, Mills J.:** An audit of the obstetric outcome of 148 consecutive pregnancies from as-

sisted concepti∞∞on: implications for neonatal services. Br J Obstet Gynaecol, 1993, 100: 820-825.
2. **Auroux M.:** Long-term effects in progeny of patemal environment and of gamete/embryo cryopreservation. Hum Reprod up date, 2000, 6: 550-563.
3. **Buitendijk SE.:** Children after in vitro fertilization. An overview of the literature. Int. J. Technol. Assess. Hlth Carewinter, 1999, 15(1): 5265.
4. **Olivennes F, Rufat P, André B, et al.:** The increased risk of complication observed in singleton pregnancies resulting from invitro fertilization (IVF) does not seem to be related to the IVF method itself. Hum Replod, 1993, 8: 1297-300.
5. **Tan SL, Doyle P, Campbell S, Beral V, Rizk B, Blinsden P, Mason B, Edwards RG.:** Obstetric outcome of in vitro fertilization pregnancies compared with normally conceived pregnancies. Am J Obstet Gynecol, 1992, 167: 778-84.
6. **Doyle P, Beral V, Maconochie N.:** Preterm delivery, low birthweight and small-for-gestational-age in livebom singleton babies lesulting from in vitro fertilization. Hum Reprod, 1992, 7: 425-28.
7. **Wang JX, Clark AM, Kirby CA, et al.:** The obstetric outcome of singleton pregnancies fomowing in-vitro feltilization/gamete intrafallopian transfer. Hum Replod, 1994, 9: 141-46.
8. **Niswander KR, Gordon M.:** The woman and their pregnancies. US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Selvice, Washington DC, publication NIH, 1972, 73-379: 198.
9. **Funderburk S.:** Offspring of subfertile parents. Int J Fertil, 1975, 20: 7378.
10. **Olsen J, Rachootin P, Schiodt AV.:** Alcohol use, conception time, and birth weights of 1500 grams or less. J Epidemiol Community Health, 1983, 37: 63-72.
11. **Williams MA, Goldman MB, Mitterdorf R, Monson RR.:** Subfertility and the risk of low birth weight. Fertil Steril, 1991, 56: 668671.
12. **Draper ES, Kurinczuk JJ, Abrams KR, Clarke M.:** Assessment of separate contributions to perinatal mortality of infertility-history and treatment: a case-control analysis. Lancet, 1999, 353: 1746-1749.
13. **Addor V, Santos-Eggimann B, Fawer CL, Paccaud F, Calame A.:** Impact of infertility treatments on the health of new-boms. Fertil Steril, 1998, 69: 210-215.
14. **Saito H, Tsutsumi O, poda Y, Ibuki Y, Hiroi M.:** Do assisted reproductive technologies have effects on the demography of monozygotic twinning? Fert Steril, 2000, 74(1): 178-179.
15. **Schieve LA, Meikle SF, Peterson HB, Jeng G, Burett NM, Wilcox LS.:** Does assisted hatching pose a risk for ∞monozygotic twinning in pregnancies conceived through in vitro fertilization? Fert Steril, 2000, 74(2): 288-294.
16. **Abusheika N, Salha O, Sharma V, Brinsden P.**: Monozygotic twinning and IVF/ICSI treatment: a report of 11 cases and review of literature. Hum Reprod, 2000, 6(4): 396-403.
17. **Knoches AM, Doyle LW.:** Long-term outcome of infants bom preterm. Baillieres Clin Obstet Gynaecol, 1993, 7(3): 633-51.
18. **Barker DJP:** Fetal and infant origins of adult disorders. Br Med J, 1993.
19. **Leese HJ, Donnay I, Thomson JG.:** Human assisted conception: a cautionary tale. Lessons from domestic animals. Hum Reprod, 1998, 13: 184-201.
20. **Rizk B, Doyle P, Tan SL, Rainsbury P, Betts J, Brinsden P, Edwards R.:** Perinatal outcome and congenital malformations in in-vitro fertilization babies from the Bourn-Hallam group. Hum Reprod, 1991, 6: 1259-1264.
21. **Silver RI, Rodriguez R, Chang TSK, Gerhard JP.:** In vitro fertilization is associated with an increased risk of hy~ospadias. J Urol, 1999, 161: 1954-1957.
22. **D Souza SW, Rivlin E, Cadman J, Richards B, Buck P, Lieberman BA.:** Children conceived by in vitro fertilization after fresh embryo transfer. Archiv Disease Childhood, 1997, 76: F70-74.
23. **Menezo YJR, Veiga A, Pouly JL.:** Assisted reproductive technology (ART) in humans: fact and uncertainties. Theriogenology, 2000, 53: 599610.
24. **De Mouzon J, Lancaster P.:** International working group for registers on assisted reproduction. J Assist Reprod Gen, 1997, 14: 2515-2655.
25. **Morin NC, Wirth FH, Johnson DH, Frank LM, Presburg HJ, Van de Water VL, Chee EM, Mills JL.:** Congenital malformations and psychosocial development in children conceived by in vitro fertilization. J Pediatr, 1989, 115: 222-227.
26. **Brandes JM, Scher A, Itzkovites J, Thaler J, Sarid M, Gersoni Baruch R.:** Growth and development of children conceived by in vitro fertilization. Pediatrics, 1992, 90: 424-429.
27. **Raoul-Duval A, Bertrand-Servais M, Letur-Konirsch H, Frydman R.:** Psychological follow-up of children born after in-vitro fertilization. Hum Reprod, 1994, 9: 1097-2101.
28. **Golombok S, Brewaeys A, Cook R.:** The European study of assisted reproduction families: family functioning and child development. HumReprod, 1996, 11: 2324-2331.
29. **Berg T, Ericson A, Hillensjo T, Nygren KG, Wennerholm UB.:** Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study. Lancet, 1999, 354: 1579-1585.
30. **Tarín JJ, Pérez-Albalá S, Cano A.:** Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes. Hum Reprod Update, 2000, 6: 532549.

31. **Walker SK, Hartwich KM, Robinson JS.:** Long-term effects on offspring of exposure of oocytes and embryos to chemical and physical agents. Hum Reprod Update, 2000, 6: 564-577.
32. **Walker SK, Heard TM, Seamark RF.:** In vitro culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. Theriogenology, 1992, 37: 111-126.
33. **Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH, Tervit HR.:** Lamb birth weight is effected by the culture system utilised during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. Biol Reprod, 1995, 53: 1385-1391.
34. **Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG.:** Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. Theriogenology, 1996, 45: 141-152.
35. **Farin PW, Farin CE.:** Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. Biol Reprod, 1995, 52: 676-68.
36. **Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J, Hansen HB.:** Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. Theriogenology, 1996, 46: 527-539.
37. **Walker SK, Hartwich KM, Seamark RF.:** The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. Theriogenology, 1996, 45: l 11 - 120.
38. **Maxfield EK, Sinclair KD, Dolman DF, Staines ME Maltin CA.:** In vitro culture of sheep embryos increases weight, primary fiber size and secondary to primary fiber ratio in fetal muscle at day 61 of gestation. Theriogenology, 1997, 47: 376 (Abst.).
39. **Sinclair KD, McEvoy TG, Carolan C, Maxfield EK, Maltin CA, Young LE, Wilmut I, Robinson JJ, Broadbent PJ.:** Conceptus growth and development following in vitro culture of ovine embryos in media supplemented with bovine sera. Theriogenology, 1998, 49: 218(Abst.).
40. **Sinclair KD, McEvoy TG, Maxfield EK, Maltin CA, Young'LE, Wilmut I, Broadbent PJ, Robinson JJ.:** Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes. J Reprod Fertil, 1999, 116: 177-186.
41. **Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA.:** Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology, 1995, 43: 141-152.
42. **Kruip TAM, den Daas JHG.:** In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. Theriogenology, 1997, 47: 43-52.
43. **Wilson JM, Williams JD, Bondioli KR, Looney CR, Westhusin ME, McCalla DF.:** Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. Anim Reprod Sci, 1995, 38: 73-83.
44. **Brown BW, Radziewic T.:** In vitro production of sheep embryos and growth rates of resultant lambs. Proc 13th Int Cong Anim Reprod, 1996, 3: P22-16 (Abst.).
45. **Holm P, Walker SK, Seamark RF.:** Embryo viability, duration of gestation and birth weighting sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or in vivo. J Reprod Fertil, 1996, 107: 175-181.
46. **McEvoy TG, Robinson JJ, Findley PA, Aitken RP, Robertson IS.:** Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of pre-implantation sheep embryos and may affect fetal growth among the survivors. Anim Reprod Sci, 1997, 47: 71-90.
47. **Crosier AE, Farin WP, Dykstra MJ,Alexander JE, Farin CE.:** Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. Biol Reprod, 2000, 62: 1459-1465.
48. **Abe A, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H.:** Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and-fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. Mol Reprod Dev, 1999, 3:1333-1335.
49. **Walker SK, Hartwich KM, Robinson JS, Seamark RF.:** Influences of in vitro culture of embryos on the normality of development. In: A. Lauria, F. Gandolfi, G. Enne and L. Gianaroli (Eds.), Gametes Development and Function. Serono symposium. Milan, 1998.
50. **Lane M, Gardner DK.:** Culture of preimplantation mouse embryos in the presence of amino acids increases post-implantation development whilst concomitant build up of ammonium induces birth defects. J Reprod Fertil, 1994, 102: 305-312.
51. **Hartwich KM, Robinson JS, Walker SK.:** Foetal outcome following the exposure of ovine embryos to high ammonium concentrations in vitro. Proc 31st Ann Conf Aust Soc Reprod Biol, 2000, 31: 67 (Abst.).
52. **Aschwood-Smith MJ:** The cryopreservation of human embryos. Hum Reprod, 1986, 1, 319-322.
53. **Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, et al.:** Effects of congelation sur la stabilité de la chromatine des spermatozoides humains: étude cytophotometrique. Fertil Contracept Sex, 1987, 15: 718-721.
54. **Bailey JL, Buhr MM.:** Ca2+ regulation by cryopreserved bull spermatozoa in response to A 23187. Crybiology, 1993, 30: 470-481.
55. **Epe B.:** DNA damage induced by photosensitization. In Halliwell B. And Aruoma OI.(eds) DNA and free radicals. Ellis Horwood'Ltd, Chichester, 1993, 96-99.
56. **Leibovitz B, Siegel BV.:** Aspect of free radical reactions in biological systems. Ageing J Gerontol, 1980, 35: 45-56.

57. **Rao B, David G.:** Improved recovery of post-thaw motility and viability of human spermatozoa cryopreserved in the presence of dithiothreitol. Cryobiology, 1984, 21, 536-541.
58. **Wakayama T, Whittingham DG, Yanagimachi R.:** Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. J Reprod Fertil, 1998, 11 - 17.
59. **Whittingham DG.:** Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at-196C. J Reprod Fertil, 1977, 49: 89-94.
60. **Al-Hasani S, Tolksdorf A, Diedrich K., et al.:** Successful in vitro fertilization of frozen thawed oocytes. Hum Reprod, 1986, 1 :309312.
61. **Glenister PH, Wood MJ, Kirby C, et al.:** The incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obteined from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. Gamete Res, 1987, 16: 205216.
62. **Chen C:** Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet, 1986, i: 884-886.
63. **Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, et al.:** Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. Hum Reprod, 1999,.14: 3077-3079.
64. **Porcu E, Fabbri R, Petracchi S, et al.:** Ongoing pregnancy after intracytoplasmic injection of testicular spermatozoa into cryopreserved human oocytes. Am J Obstet Gynecol, 1999, 180: 10441045.
65. **Wurfel W, Schleyer M, Krusmann G, et al.:** Fertilization of cryopreserved and thawed human oocytes (Cryo-Oo) by injection of spermatozoa (ICSI): medical management of sterility and case report of a twin pregnancy. Zentralbl Gynakol, 1999, 121: 444-448.
66. **Magistrini M, Szollosi D.:** Effects of cold and isopropyl-N-phenyl carbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. Eur J Cell Biol, 1980, 22: 699-707.
67. **Pickering SJ, Johnson MH.:** The influence of cooling on the organisation of the meiotic spindle of the mouse oocytes. Hum. Reprod, 1987, 2: 207-216.
68. **Sathananthan AH, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS, Mok H, Lee MN.:** The effect of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. Gamete Res, 1988, 21, 385-401.
69. **Tsunoda Y, Parkening TA, Chang MC.:** In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing. Experientia, 1976, 32: 223-224.
70. **Carroll J, Warnes GM, Matthews CD.:** Increase in digyny explains poliploidy after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. J Reprod Fertil, 1989, 85: 489-494,
71. **Bouquet M, Selva J, Auroux M.:** The incidence of cromosomal abnormalities in frozen-thawed mouse oocytes after in vitro fertilization. Hum Reprod, 1992, 7: 76-80.
72. **Bouquet M, Selva J, Auroux M.:** Cryopreservation of mouse oocytes: Mutagenic effects in the embryo? Biol Reprod, 1993, 49: 764-769.
73. **Salat-Bauroux J, Cornet D, Alvarez S, et al.:** Hormonal secretions in singleton pregnancies arising from the implantation of fresh or frozen embryos after oocyte donation in woman with ovarian failure. Fertil Steril, 1992, 57: 150-154.
74. **Dulioust E, Toyama K, Busnel M, et al.:** Long-term effects of embryo freezing in mice. Proc Nat Acad Sci USA, 1995, 92: 589-93.
75. **Liu J, Van Den Abbeel E, Van Steiteghem A.:** Assessment of ultrarapid and slow freezing procedures for 1-cell and 4-cell mouse embryos. Hum Reprod, 1993, 7: 1115-1119.
76. **Rall WF, Wood MJ, Kirby C, et al.:** Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. J Reprod Fertil, 1987, 80: 499-504.
77. **Trounson A, Peura A, Freeman L, et al.:** Ultrarapid freezing of early cleavage state human embryos and eight cell mouse embryos. Fertil Steril, 1988, 49: 822-826.
78. **Wilson L, Quinn P.:** Development of mouse embryos cryopreserved by an ultrarapid method of freezing. Hum Reprod, 1989, 4: 86-90.
79. **Shaw JM, Trounson A.:** Effect of dimethylsulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse embryos frozen with a rapid freezing technique. Cryobiology, 1989, 26: 413-421.
80. **Olivennes F, Schneider Z, Remy V, et al.:** Perinatal outcome and follow-up of 82 children aged 1-9 years old conceived from cryopreserved embryos. Hum Reprod, 1996, 11: 1565-68.
81. **Suttcliffe AG, Souza SWD, Cadman J, et al.:** Minor congenital anomalies, major congenital malformations and development in children conceived from cryopreserved embryos. Hum Reprod, 1995, 10: 3332-37.
82. **Wennerholm UB, Hamberger L, Nilsson L, et al.:** Obstetric and perinatal outcome of children conceived from cryopreserved embryos. Hum Reprod, 1997, 12: 1819-25.
83. **Wennerholm UB, Albertsson-Wikland K, Bergh C, et al.:** Post-natal growth and health in children born after cryopreservation as embryos. Lancet, 1998, 351: 1085-1090.
84. **Dulioust E, Busnel MC, Carlier M, et al.:** Safety of embryo preservation: facts and artefacts. Hum Reprod, 1999, 14: 1141-1145.
85. **Bonduelle M, Camus M, De Vos A, Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Verheyen G, Devroey P, Liebaers I, Steirteghem AV.:** Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 sub-

sequent children. Hum Reprod, 1999, 14: 243-264.
86. **Wennerholm UB, Berg C, Hamberger L, Lundin K, Nilsson L, Wikland M, Kallén B.:** Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. Hum Reprod, 2000, 15(4): 944-948.
87. K**urinczuk JJ, Bower C.:** Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. BMJ, 1997, 315: 1260-6.
88. **Pieters MHEC, Speed RM, Vreeburg JTM, Dohle G, In't Veld PA.:** Evidence of disturbed meiosis in a man referred for intracytoplasmic sperm injection. Lancet, 1998, 351: 957.
89. **Hewitson L, Dominko T, Takahashi D, Martinovich C, RamalhoSantos J, et al.:** Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. Nat Med, 1999, 5(4): 431-433.
90. **Terada Y, Luetjens CM, Sutovsky P, Schatten G.:** Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: Does ICSI itself introduce chromosomal anomalies?. Fertil Steril, 2000, 74(3): 454-450.
91. **Kremer JAM., Tuerlings JHAM, Borm G, Hoefsloot LH, Meuleman EJH, Braat DDM, Brunner HG, Merkus HMWM.:** Does intracytoplasmic sperm injection lead to a rise in the frequency of microdeletions in the AZFc region of the Y chromosome in future generations? Hum Reprod, 1998, 13(10): 2808-2811.
92. **Meschede D, De Geyter C, Nieschlag E, Horst J.:** Genetic risk in micromanipulative assisted reproduction. Hum Reprod, 1995, 10(11): 2880-2886.
93. **Meschede D, Lemcke B, Behre HM, De Geyter Ch, Nieschlag E, Horst J.:** Non-reproductive heritable disorders in infertile couples and their first degree relatives. Hum Reprod, 2000, 15(7): 1609-1612.
94. **Meschede D, Lemcke B, Behre HM, De Geyter Ch, Nieschlag E, Horst J.:** Clustering of male infertility in the families of couples treated with intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 2000, 15(7): 1604-1608.
95. **Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M.: Embryonic de**velopment in vitro is compromised by the ICSI procedure. Hum Reprod, 2000, 15(7): 1592-1596.
96. **Menezo Y, Barak Y.:** Comparison between day-2 embryos obtained either from ICSI or resulting from short insemination IVF: influence of matemalage. Hum Reprod, 2000, 15(8): 1776-1780.
97. **Shoukir Y,Chardonnes D, Campana A, Sakkas D.:** Blastocyst development from supemumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a patemal influence? Hum Reprod, 1998, 13:16321637.
98. **Bowen JR, Gibson FL, Garth IL, Saunders DM.:** Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. Lancet, 1998, 351: 1529-1534.
99. **Bonduelle M, Joris H, Hofmans K, Liebaers I, Van Steirteghem A.:** Mental development of 201 ICSI children at 2 years of age. Lancet, 1998, 351: 1553.
100. **Bonduelle M, Legein J, Buysse A,et al.:** Prospective follow-up of 423 children born after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 1996, 11: 1558-1564.
101. **Bonduelle M, Buysse A,Van Assche E, et al.:** Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with ejaculated, epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. HumReprod, 1996, 11: 131-155.
102. **Palermo G, Colombero L, Schattman G,et al.:** Evolution of pregnancies and initial follow-up of newborns delivered after intracytoplasmic sperm injection. J Am Med Soc, 1897, 276: 1893.
103. **Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, et al.:** Obstetric and perinatal outcome of pregnancies following intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 11: 1113-1119.
104. **Sutcliffe AG, Taylor B, Grudzinskas G, et al.:** Children conceived by intracytoplasmic sperm injection. Lancet, 1998, 352: 578-579.
105. **Penketh R, McLaren A.:** Prospects for prenatal diagnosis during preimplantation human development. Bailliere's Clin Obstet Gynaecol, 1987, 1: 747-764.
106. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, horn GT, Erlich HA, Arnheim N.:** Enzymatic amplification of (-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1985, 230: 1350-1354.
107. **Tarín JJ, Handyside AH.:** Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis. Fertil Steril, 1993, 59(5): 943-951.
108. **Gentry WL, Critser ES.:** Growth of Mouse Pups Derived From Biopsed Blastocysts. Obstet Gynecol,, 1995 85(6): 1003-1006.
109. **Eshre PGD.:** Eshre Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: data collection II (May 2000). Hum Reprod, 2000, 15: 2673 2683.