

Resultados de la aplicación de distintas técnicas en los laboratorios de reproducción asistida de alta complejidad. Su evolución a lo largo del tiempo. La visión desde el Laboratorio del IFER

Alberto Valcárcel, Marisa Tiverón, Mercedes Guidobono, Alejandra Castro, Alberto Kenny, Luis María Auge, Edgardo Young

Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2013;28:105-115

Resumen

Se presentan los resultados de la aplicación de distintas técnicas de reproducción asistida de alta complejidad en el IFER durante el período 1994-2012. En pacientes de buen pronóstico la tasa de embarazo aumentó desde un 28% a un 55%, la tasa de implantación de un 11% a un 21% y el número de embriones transferidos disminuyó de 4 a 2,6 en promedio. Un 30% de los procedimientos produce embriones supernumerarios. La vitrificación de oocitos y embriones ha suplantado progresivamente al congelamiento lento. La tasa de embarazo obtenida por el uso de embriones congelados/descongelados en el período 1995-2006 fue 30% en promedio. El uso de la técnica de vitrificación/desvitrificación elevó la tasa de embarazo a un 45% en promedio (período 2007-2012). La población que se atendió en IFER en los últimos 10 años está formada por un 55,1% de pacientes mayores de 40 años o menores de 40 años que obtuvieron menos de 3 oocitos MII en fresco. El uso de columnas de anexina V mostró que podría ser efectivo para casos sin factor oocitario asociado (60,4% vs 51,6% control), pero que no representa mejora en los casos de factor oocitario asociado (22,4% vs 20,4% control). La tasa de embarazo por transferencia con oocitos vitrificados/desvitrificados en pacientes que no aceptaron criopreservar embriones fue de 30,8% (33/107). La tasa de embarazo

global (incluye a todos los pacientes tratados) varió desde un 25% en promedio para el período 1994-2001 hasta un 35% en promedio en la actualidad. La tasa de embarazo acumulada (considerando el efecto de poseer embriones criopreservados) se ha incrementado desde un 35% en 1995 hasta un 77% actual. La utilización de embriones criopreservados para un procedimiento en particular eleva la tasa de embarazo acumulada en un 14% en promedio.

Palabras claves. Fertilización in vitro, Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, congelación/descongelación de embriones, tasa de embarazo, tasa de implantación.

Results of the application of various techniques in assisted reproduction technology (ART) laboratories. Their evolution through time. The Laboratory point of view

Summary

We present the results of different techniques of assisted reproductive technology (ART) between 1994-2012. In this period, the number of annual ART procedures has increased, being more than a thousand since 2005. In good prognosis patients (less than 40 years old and 3 or more MII oocytes at the moment of the oocyte retrieval) the pregnancy rate increased, through the years, from 28% to 55%; the implantation rate increased from 11% to 21%; and the number of embryos transferred decreased from 4 to 2.6 on average. Around 30% of the ART procedu-

Correspondencia: Alberto Valcárcel
Marcelo T. de Alvear 2259 Piso 1, (1122). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Tel.: 54-11-5777-2561
E-mail: avalcarcel@hotmail.com

res produce supernumerary embryos, which must be frozen. This number remains constant since 2006. Oocyte and embryo vitrification has gradually replaced the slow freezing technique. The pregnancy rate obtained by the use of frozen/thawed embryos in the period 1995-2006, was 30% on average. Using the technique of vitrification, pregnancy rate rose to 45% on average (2007-2012). Over the last 10 years, patients older than 40 years old (using their own eggs) or patients younger than 40 years old with less than 3 MII oocytes, which is an older population and with poor reproductive prognosis, represented 55.1% of the patients treated at IFER. The implementation of annexin V columns as an additional selection method for sperm with nuclear fragmentation, showed that its use may be effective in cases without associated oocyte factor (60.4% vs. 51.6% control), but that does not represent any improvement in cases with associated oocyte factor (22.4% vs. 20.4% control). The pregnancy rate per transfer using vitrified/ thawed oocytes in patients who did not accept cryopreserved embryos was 30.8% (33/107). The overall pregnancy rate (including all patients treated) ranged from 25% on average for the 1994-2001 period, up to 35% at the present time. The cumulative pregnancy rate (considering the effect of having embryos cryopreserved) has increased steadily, from 35% in 1995 up to 77% today. The use of cryopreserved embryos raises the cumulative pregnancy rate by 14% on average.

Key words. *In vitro fertilization, ICSI, frozen-thawed embryos, pregnancy rate, implantation rate.*

Introducción

La infertilidad es un tema de interés tanto en la investigación como en la práctica clínica. Es importante recordar la magnitud de la misma, ya que afecta aproximadamente a una de cada seis parejas a nivel mundial.¹ Es un trastorno de la salud reproductiva y es reconocido como tal por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Por otra parte, la infertilidad es uno de los pocos términos médicos que es relacional, esto es, que implica una condición o problema que incluye o involucra a una pareja y no a un individuo aislado.²

Se ha estimado que a la fecha el número de bebés nacidos como resultado de las tecnologías de reproducción asistida de alta complejidad (fertilización in

vitro e ICSI) ha llegado a los 5 millones desde que Louise Brown naciera en julio de 1978.³ Estos valores fueron presentados en la 28ª Reunión Anual de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología que se desarrolló en Estambul (Turquía) entre los días 1 y 4 de julio de 2012.

Es por ello que resulta interesante analizar el estado de la aplicación de las técnicas que habitualmente se utilizan en los centros de reproducción asistida en nuestro país. El IFER ha sido una de las instituciones pioneras en reproducción asistida en Argentina, y por ello esta reseña lo toma como caso testigo de la evolución seguida por la implementación de diversas metodologías y su efecto en los resultados reproductivos alcanzados.

Como es sabido, desde el comienzo del desarrollo de las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad se han producido mejoras en cada una de las etapas que las constituyen. Para una reseña de estos avances se puede consultar bibliografía pertinente.⁴⁻¹⁶

En el caso particular del IFER, comienza su actividad en la reproducción asistida en el año 1985, llegando al año 1994 con un total de 1.075 procedimientos de alta complejidad. Con la puesta a punto de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, según su sigla en inglés) por los Dres Palermo y Van Steirteghem en 1992¹⁷ se logra dar respuesta a los casos de infertilidad por factores masculinos severísimos. Esta tecnología, revolucionaria por entonces, está disponible en nuestro país desde 1994, registrándose el primer embarazo por esta técnica en el IFER en el año 1995.

Desde esos primeros años, el número de procedimientos de fertilización asistida de alta complejidad ha ido aumentando progresivamente, superándose los mil procedimientos anuales desde el año 2005 y hasta la fecha, con un total de 5.634 en los últimos 5 años (Figura 1).

Otro eslabón importante en las técnicas asociadas a la fecundación *in vitro* fue el desarrollo exitoso del congelamiento y descongelamiento lento de embriones humanos.¹⁸⁻²⁰ Esta tecnología estuvo disponible en Argentina desde 1987 e implementada en el IFER en forma clínica desde el año 1994.

A partir de ese año (1994) se implementaron en forma clínica una serie de tecnologías reproductivas (criopreservación lenta de gametas y embriones, eclosión asistida, transferencia em-

brionaria guiada por ecógrafo, entre otras) que permitieron asegurar resultados concordantes con los obtenidos en los centros de reproducción asistida de otras latitudes.

De estas técnicas mencionadas, la criopreservación lenta de embriones es la que tuvo el más alto impacto sobre el incremento en el número de embarazos viables.²¹

Así, en el período 1994-2007, en el IFER se realizaron 3.554 procedimientos de criopreservación de embriones provenientes de 8.514 procedimientos de fertilización asistida.

Un nuevo salto cualitativo se produce en el año 2008, con el advenimiento en forma clínica de la vitrificación de oocitos y embriones como alternativa al congelamiento lento de los mismos. La vitrificación con resultados repetibles y confiables había sido presentada a nivel mundial en el año 2005.²²⁻²⁵

El número de procedimientos de congelamiento/vitrificación de embriones fue incrementándose paulatinamente con los años, observándose un incremento sustancial a partir del año 2004 y en adelante (Figura 2).

Figura 1. Distribución del número de procedimientos de Alta Complejidad por año en el IFER (Período 1994-2012).

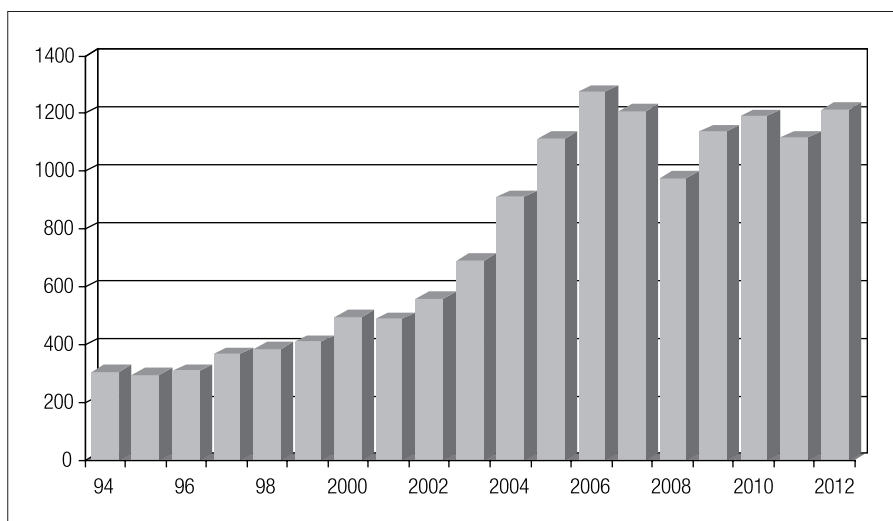
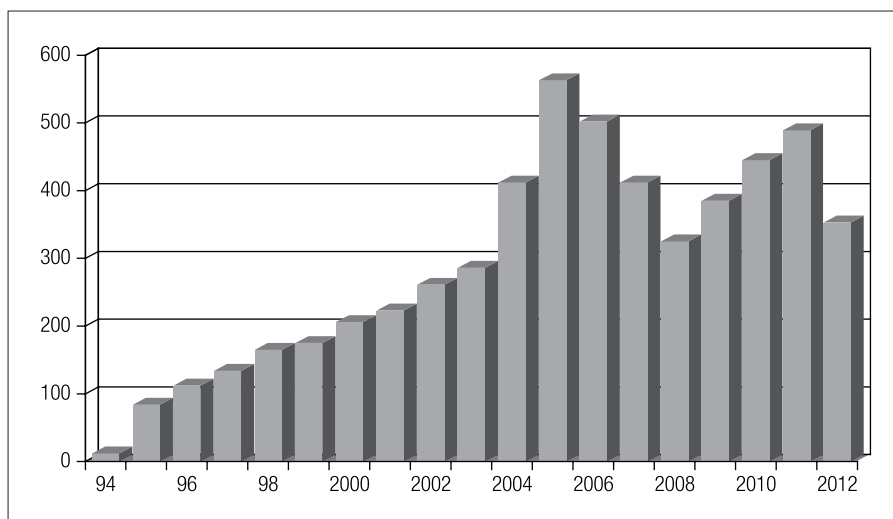


Figura 2. Distribución del número de procedimientos de congelamiento lento / vitrificación de embriones en el IFER. Período 1994-2012.



Estos resultados indican que en los últimos 5 años se realizaron un total de 1.997 procedimientos de criopreservación/vitrificación embrionaria, lo que representó un 36% del total de procedimientos realizados a la fecha (5.544).

Sin embargo, cuando analizamos qué proporción del total de procedimientos de reproducción asistida en fresco produjeron un número tal de embriones que debieron criopreservarse una parte, vemos que a partir del año 2008 esta proporción se mantiene aproximadamente constante en torno al 30% de los procedimientos (Figura 3). El motivo fundamental del por qué no se ha incrementado;

debemos buscarlo en que parte de la población que realiza procedimientos de alta complejidad en IFER elige vitrificar oocitos por diversas razones,^{26,27} y en parte, a que nuestra población tratada se caracteriza por ser mayoritariamente añosa, y por lo tanto, dispone de un menor número de oocitos a fecundar, lo que producirá un menor número de embriones, los cuales serán transferidos en fresco exclusivamente.

Si analizamos el comportamiento de los pacientes respecto a la vitrificación oocitaria, vemos que la misma se ha incrementado desde su implementación y que representa una alternativa de elección creciente para algunos pacientes (Figura 4).

Figura 3. Distribución del porcentaje de procedimientos de fertilización asistida en los que parte de los embriones producidos se criopreservaron. Período 1994-2012.

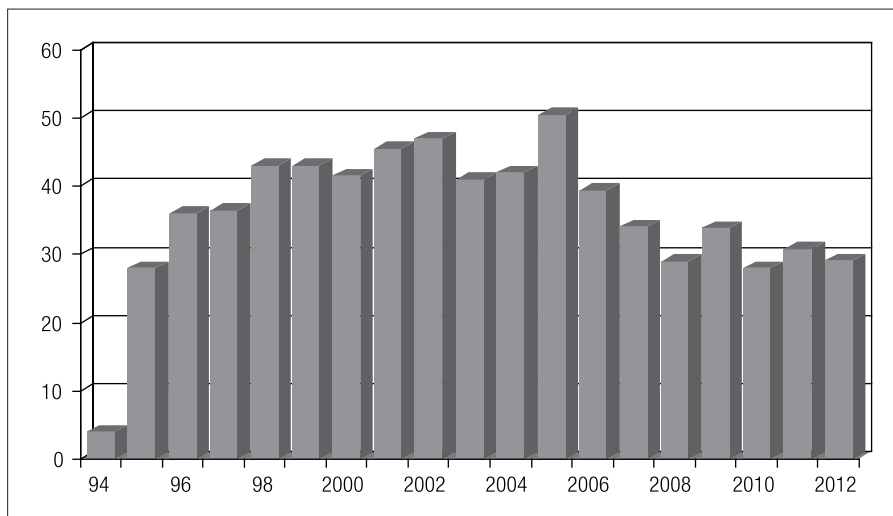
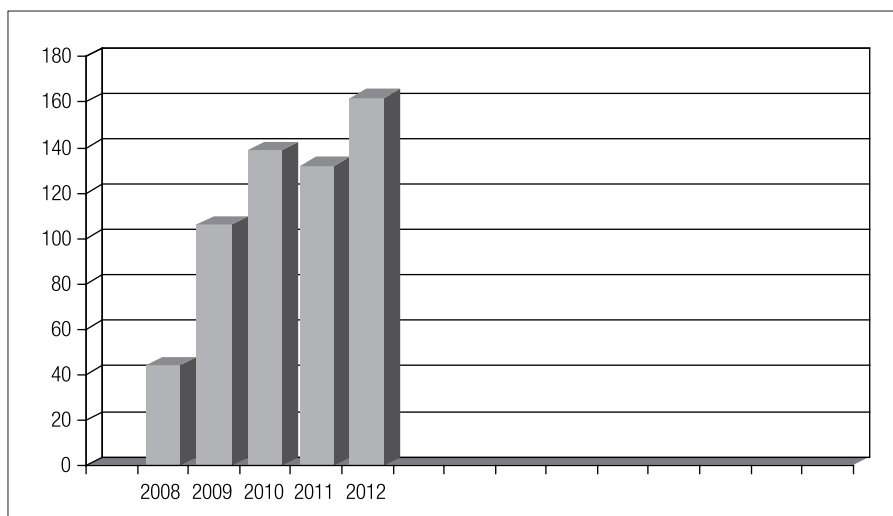


Figura 4. Distribución del número de procedimientos de vitrificación de oocitos. Período 2008-2012.



Independientemente de lo referido al almacenamiento de oocitos, la alternativa mayoritaria en nuestro de centro continúa siendo la criopreservación de embriones.

Desde el año 2008, y en concordancia con lo que ocurre a nivel mundial, la técnica de criopreservación elegida mayoritariamente es la vitrificación.²⁸⁻²⁹ La Tabla 1 nos muestra cómo se ha comportado la elección técnica al momento de criopreservar.

Como puede verse, el congelamiento lento de oocitos pronucleados y embriones de día 2 y de día 3 fue progresivamente sustituido por la vitrificación de los mismos. Tanto la vitrificación de oocitos como de blastocistos se transformó en la única manera de criopreservar a partir del año 2008. A la fecha, el congelamiento lento de tejido ovárico sigue siendo la técnica de elección en nuestro Instituto.

A continuación se presenta el número de pro-

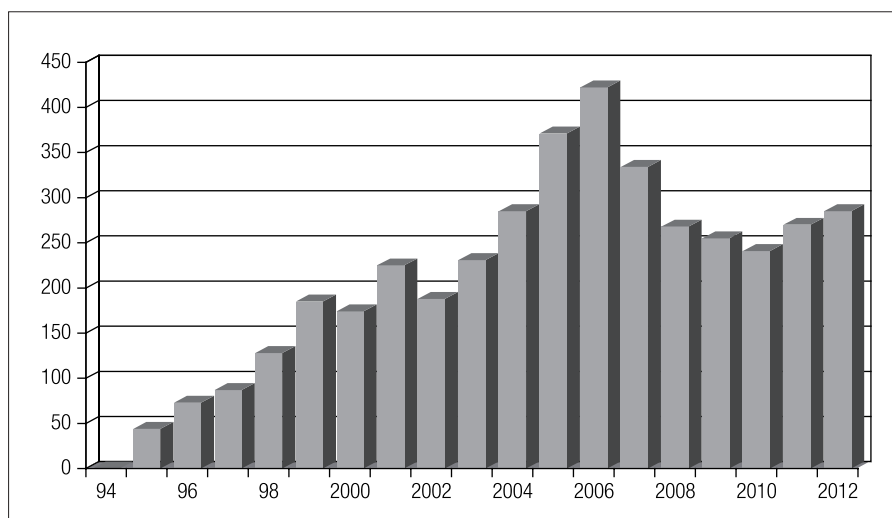
cedimientos de descongelación de embriones para su posterior transferencia en el período 1994-2012 (Figura 5). Como puede verse, a lo largo de los primeros años hubo un incremento gradual del número de procedimientos, hasta alcanzarse valores muy altos en el período 2005-2007. A partir de ese año, el número de procedimientos de descongelación/desvitrificación se mantiene aproximadamente constante y próximo a los 250 procedimientos anuales.

Al analizar la evolución de las tasas de embarazo producidos en el IFER, debemos considerar separadamente el período 1985-1993 y el período 1994-2012. Mientras que el primero de ellos se caracterizó por tasas de embarazo relativamente bajas pero gradualmente crecientes, producto del inicio en la actividad y la ausencia de embriones congelados disponibles de estos procedimientos, el período 1994-2012 se comportó de manera distinta.

Tabla 1. Comportamiento en la elección de la técnica de criopreservación entre los años 2008-2012.

Año	2008	2009	2010	2011	2012
Tipo de criopreservación					
Congelamiento lento de pronucleados	136	106	66	0	0
Congelamiento lento de embriones D2/D3	114	16	0	0	0
Vitrificación de embriones D2/D3	0	97	185	245	302
Vitrificación de oocitos	44	106	139	132	162
Vitrificación de blastocistos	31	54	59	52	47
Congelamiento lento de tejido ovárico	5	2	7	4	1

Figura 5. Distribución del número de procedimientos de descongelación/desvitrificación de embriones previamente congelados para su posterior transferencia. Período 1994-2012.



La Figura 6 muestra la distribución de la tasa de embarazo por transferencia en fresco, la tasa de implantación y el número promedio de embriones transferidos por procedimiento en pacientes de buen pronóstico durante el período 1994-2012. Definimos como paciente de buen pronóstico a aquella que obtuvo 3 o más oocitos maduros (metafase II) en la punción oocitaria en fresco y es menor de 40 años de edad; mientras que hablamos de pacientes con mal pronóstico si no cumplen con alguna de las dos condiciones expresadas anteriormente. Como puede observarse tanto la tasa de embarazo en fresco como la de implantación presentan un gradual pero constante incremento a lo largo de los años.

En el caso particular de la tasa de embarazo en fresco, a partir del año 2001 se observa un incremento significativo de los valores y permanece alta hasta la fecha.

Estos incrementos en la tasa de embarazo en fresco no tienen relación con la cantidad de embriones transferidos, debido a que durante el período analizado no hay una diferencia significativa en el número de embriones transferidos.

En este sentido y dadas las condiciones de nuestro laboratorio, atribuimos este aumento al cambio en el tipo de medio de cultivo utilizado, ya que a partir del año 2001 se empezó a utilizar medio de cultivo secuencial en lugar del medio de cultivo no secuencial que se utilizaba hasta entonces.³⁰

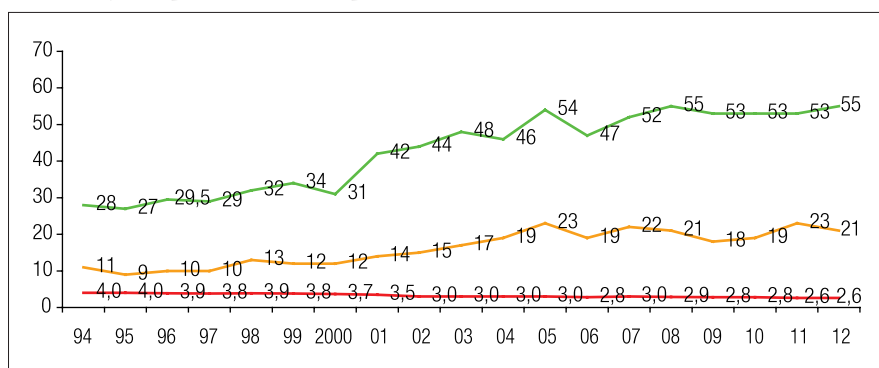
Por otra parte, y en concordancia con los registros internacionales,³¹⁻³² hay un esfuerzo permanente en la disminución del número de embriones a transferir con la intención de disminuir el riesgo

de embarazo múltiple. En nuestro caso, el número promedio de embriones transferidos pasó de 4 en 1994 a los 2,6 actuales (2012).

Paralelamente a los esfuerzos en mejorar los procedimientos médicos sobre la mujer, entre los años 2005 y 2010 hubo una nueva corriente que reevaluó el efecto del espermatozoide (y por ende, el efecto paterno) en las tasas de embarazo y que centró su interés en desarrollar técnicas en las que la selección se realizara sobre el espermatozoide a ser utilizado en un procedimiento de ICSI. Así surgieron la inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI, según su sigla en inglés),³³⁻³⁴ el uso de la birrefringencia de la cabeza del espermatozoide bajo luz polarizada,³⁵⁻³⁶ la unión de espermatozoides al ácido hialurónico (PICSI, según su sigla en inglés)³⁷⁻³⁸ y el uso de columnas de anexina V para la selección de espermatozoides sin fragmentación del ADN nuclear.³⁹⁻⁴² A pesar de surgir una gran cantidad de publicaciones en las que se presentan los resultados reproductivos de la aplicación de estas técnicas, todas ellas presentan resultados controversiales y ha sido cuestionada su validación.⁴³⁻⁴⁵

En el caso particular del IFER, para pacientes con factor masculino severo en los que había aumentado los niveles de fragmentación nuclear del espermatozoide, iniciamos la utilización de la selección de espermatozoides por el uso de columnas de anexina V. La aplicación desde el año 2009 de esta técnica en una población seleccionada de pacientes en los que sólo había involucrado factor masculino mostró una tasa de embarazo clínico de 60,4% (125/207). Si bien

Figura 6. Distribución de la tasa de embarazo por transferencia en fresco (verde), la tasa de implantación (amarillo) y el número promedio de embriones transferidos por procedimiento (rojo) en pacientes de buen pronóstico. Período 1994-2012.



fue superior a la obtenida en pacientes que no utilizaron columnas de anexina como método de selección adicional (51,6%, 110/213), estos valores no resultaron estadísticamente significativos. En el caso particular de pacientes en los que al factor masculino se le debe sumar un factor femenino severo, nuestros resultados mostraron que la selección sobre los espermatozoides por el uso de columnas de anexina no mejora los rendimientos reproductivos (22,4%; 88/393 para columnas de anexina y 20,4%, 63/309 sin columnas de anexina). Es importante mencionar que a la fecha tenemos registrado un total de 56 partos con nacimiento y 30 embarazos evolutivos por el uso de columnas de anexina, y que todos los nacidos han sido normales.⁴⁶

Como indicamos previamente, la criopreservación embrionaria ha sido la tecnología más importante de las implementadas a la fecha en las técnicas de reproducción asistida. La Figura 7 muestra la distribución de la tasa de embarazo por transferencia en procedimientos de descongelamiento/desvitrificación, la tasa de implantación y el número promedio de embriones transferidos por procedimiento en pacientes de buen pronóstico.

Como puede observarse, la tasa de embarazo en procedimientos de congelamiento lento/descongelamiento lento de embriones se mantuvo aproximadamente constante a lo largo del tiempo y en el orden del 30%. Pero con el advenimien-

to de la vitrificación/desvitrificación embrionaria, las tasas de embarazo obtenidas con los embriones supernumerarios criopreservados se incrementaron a valores cercanos al 45% en promedio.

Presenta un interés particular la reseña de los resultados obtenidos a partir de la implementación de la vitrificación/desvitrificación oocitaria en pacientes que no desean criopreservar embriones por diversas razones.

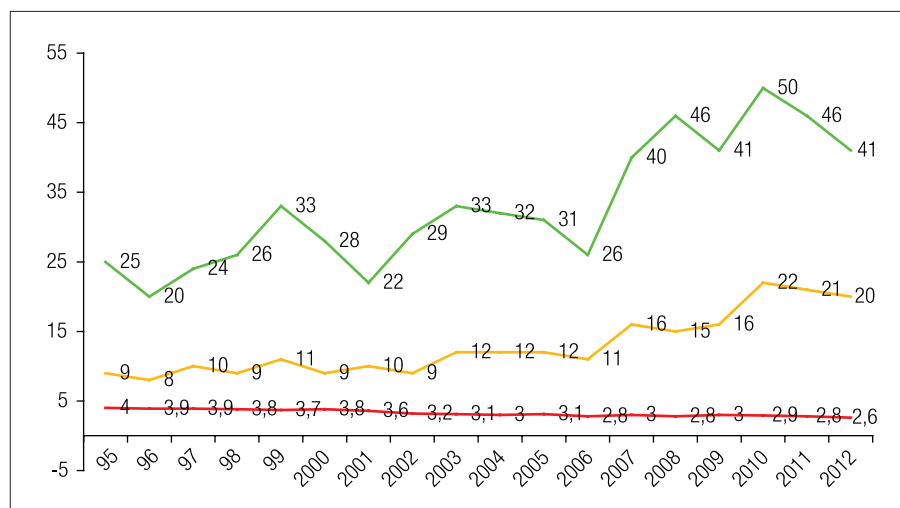
A partir de la implementación de esta tecnología en nuestro laboratorio,⁴⁷ los resultados mostraron que la vitrificación y desvitrificación oocitaria representa una alternativa con resultados aceptables para pacientes en los que la criopreservación embrionaria no es aceptable.

En el período 2008-2012 un total de 107 parejas estériles recurrieron a la desvitrificación de los oocitos previamente vitrificados. Se desvitrificaron un total de 611 oocitos correspondientes a estas 107 parejas. La sobrevida oocitaria obtenida fue 92,0% (562/611). La tasa de fertilización correspondiente fue 66,9% (376/562) y la tasa de embarazo clínico por transferencia correspondiente fue de 30,8% (33/107).

Estos resultados son inferiores a los obtenidos por el uso de embriones supernumerarios vitrificados/desvitrificados, pero es la única alternativa aceptable para estas parejas.

Habiendo reseñado la experiencia del IFER en pacientes definidos como de buen pronóstico

Figura 7. Distribución de la tasa de embarazo por transferencia en procedimientos de descongelación/desvitrificación para pacientes de buen pronóstico (verde), la tasa de implantación (amarillo) y el número promedio de embriones transferidos por procedimiento (rojo).



por un lado, y los resultados de la totalidad de los pacientes que desvitrificaron oocitos, nos referiremos ahora al análisis de los resultados globales, esto es, aquellos que incluyen a la totalidad de los procedimientos realizados, independientemente del pronóstico de los pacientes involucrados.

Esta aclaración es pertinente, ya que el IFER se caracteriza porque la población que realiza procedimientos de fertilización asistida de alta complejidad está constituida mayoritariamente por pacientes que habitualmente son considerados de mal pronóstico, siendo pacientes mayores de 40 años o menores de 40 años en las que se obtuvieron 3 MII o menos luego de la estimulación ovárica y la punción oocitaria en fresco. Así, en el período 2002-2012 el porcentaje de pacientes tratadas de mal pronóstico fue 55,1% (4.756/8.638), mientras que el porcentaje de pacientes de buen pronóstico constituyó un 44,9% (3.882/8.638).

La Figura 8 presenta la distribución de la tasa de embarazo clínico global (incluye la totalidad de los pacientes tratados) en fresco a lo largo del período 1994-2012.

Como se puede ver, los resultados en el período 1994-2001 permanecieron relativamente constantes en torno a tasas globales del 25%. A partir de esa fecha, y como consecuencia del cambio del medio de cultivo al tipo secuencial, se produjo un incremento en la tasa de embarazo global que permanece constante desde entonces y en el orden del 35%.

Por último, dentro de esta reseña la Figura 9 muestra la distribución de la tasa de embarazo para procedimientos en fresco, para procedimientos de descongelación/desvitrificación de embriones, y la tasa de embarazo acumulada (considerando el efecto de los embriones descongelados/desvitrificados en un ciclo fresco) para pacientes de buen pronóstico en el período 1994-2012. Incluye también la distribución del porcentaje de incremento en la tasa de embarazo como consecuencia de la utilización de los embriones congelados provenientes de un ciclo en fresco.^{48,49} Esta tasa es, en promedio, de un 14,0% a lo largo del tiempo.

Tomando al IFER como ejemplo representativo de centros de reproducción asistida en nuestro país, esta reseña muestra que el desempeño en cuanto a la calidad y mejoramiento en los resultados a lo largo del tiempo es progresivo y permanente. De manera que el servicio ofrecido a la comunidad se encuentra en consonancia con los desarrollos y metodologías probadas en otras latitudes. De esta manera, ha existido un incremento gradual y constante de las tasas de embarazos logrados en procedimientos de reproducción asistida de alta complejidad, tanto con embriones en fresco como con embriones descongelados/desvitrificados. Este incremento constante consolida y traduce una tarea de búsqueda permanente de la excelencia en los servicios brindados por los laboratorios de reproducción asistida en la Argentina.

Figura 8. Distribución de la tasa de embarazo global fresco. Período 1994-2012.

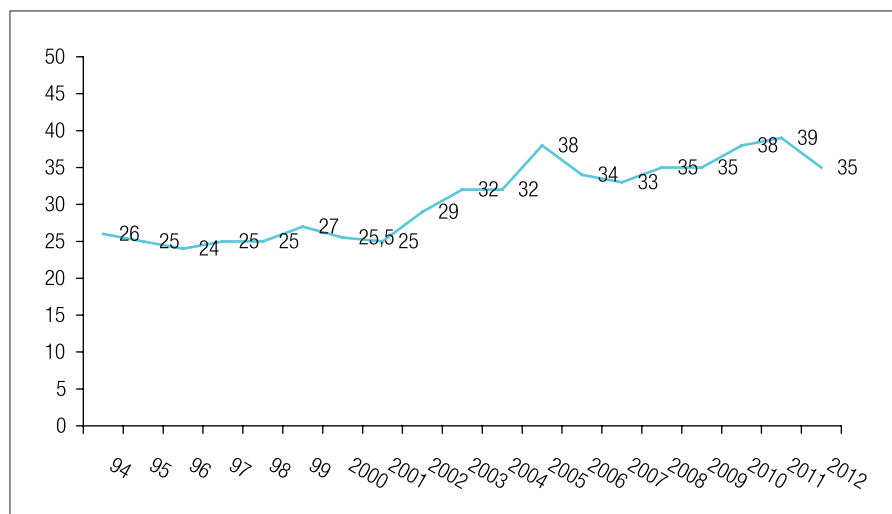
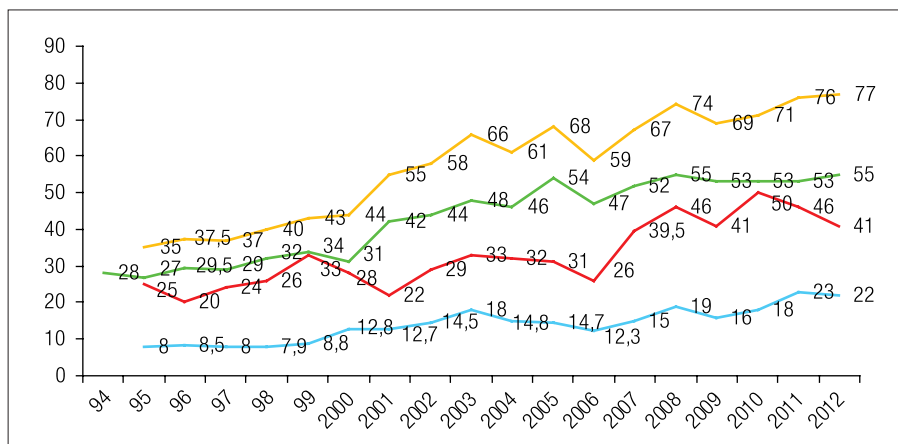


Figura 9. Distribución de la tasa de embarazo para procedimientos en fresco (verde), para procedimientos de descongelación de embriones (rojo), y la tasa de embarazo acumulada (amarillo) (considerando el efecto de los embriones descongelados/desvitrificados en un ciclo fresco) para pacientes de buen pronóstico. Incluye también la distribución del porcentaje de incremento en la tasa de embarazo como consecuencia de la utilización de los embriones congelados provenientes de un ciclo en fresco (celeste).

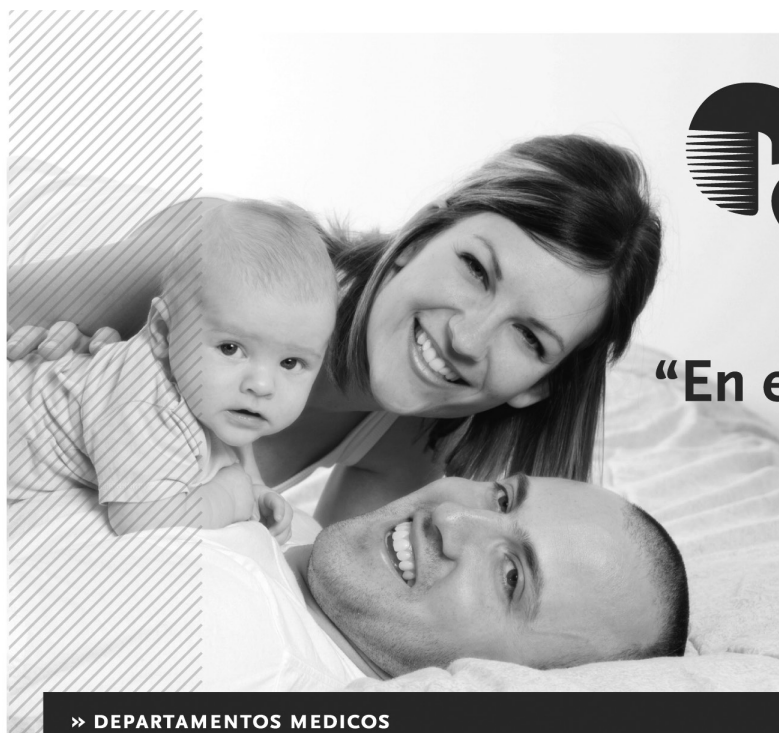


Referencias

1. Brugo Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definición y causas de la infertilidad. Rev Med Reprod (Buenos Aires), 2002;5(1):29-45.
2. Murphy JS. Should Lesbians Count as Infertile Couples? Antilebian Discrimination in Assisted Reproduction, en Donchin A y Purdy LM. (eds.), Embodying Bioethics: Recent Feminist Advances, Lanham MD, Rowman and Littlefield, 1999;103-120.
3. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet, 1978;2:366.
4. Marci R, Graziano A, Lo Monte G, Piva I, Soave I, Marra E, Lisi F, Moscarini M, Caserta D. GnRH antagonists in assisted reproductive techniques: a review on the Italian experience. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013;17(7):853-873.
5. Cakmak H, Rosen MP. Ovarian stimulation in cancer patients. Fertil Steril, 2013;99(6):1476-1484.
6. Pavone ME, Bulun SE. Clinical review: The use of aromatase inhibitors for ovulation induction and superovulation. J Clin Endocrinol Metab, 2013;98(5):1838-1844.
7. Kol S, Humaidan P. GnRH agonist triggering: recent developments. Reprod Biomed Online, 2013;26(3):226-230.
8. Roque M, Sampaio M, Geber S. Follicular flushing during oocyte retrieval: a systematic review and meta-analysis. J Assist Reprod Genet, 2012;29(11):1249-1254.
9. Levy G, Hill MJ, Ramirez CI, Correa L, Ryan ME, DeCherney AH, Levens ED, Whitcomb BW. The use of follicle flushing during oocyte retrieval in assisted reproductive technologies: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod, 2012;27(8):2373-2379.
10. Machtinger R, Racowsky C. Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. Reprod Biomed Online, 2013; 26(3):210-221.
11. Wong C, Chen AA, Behr B, Shen S. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. Reprod Biomed Online, 2013;26(2):120-129.
12. Zollner U, Dietl J. Perinatal risks after IVF and ICSI. J Perinat Med, 2013;41(1):17-22.
13. El-Toukhy T, Sunkara S, Khalaf Y. Local endometrial injury and IVF outcome: a systematic review and meta-analysis. Reprod Biomed Online, 2012;25(4):345-354.
14. Sathananthan AH, 2013. Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction: a personal survey. Micron. 44:1-20.
15. Smith GD, Monteiro da Rocha A. Advances in embryo culture systems. Semin Reprod Med, 2012;30(3):214-221.
16. Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. Hum Reprod, 2012;27(5):1277-1285.
17. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet, 1992; 340:17-18.

18. Wennerholm UB, Söderström-Anttila V, Bergh C, Aittomäki K, Hazekamp J, Nygren KG, Selbing A, Loft A. Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. *Hum Reprod*, 2009;24(9):2158-2172.
19. Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2009;21(3):270-274.
20. Herrero L, Martínez M, García-Velasco JÁ, 2011. Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 23(4):245-250.
21. Tiverón M, Valcárcel A, Gomez Peña M, Guidobono M, Lombardi C, Young E. Resultados del programa de criopreservación de oocitos pronucleados y embriones del IFER. Perspectiva desde el laboratorio. *Fertilidad (Buenos Aires)*, 2007;3(2):5-9.
22. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*, 2005;11(3):300-308.
23. Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online*, 2005;11(1):53-57.
24. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*, 2005;11(5):608-614.
25. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 2007;67(1):73-80.
26. Klock SC. Embryo disposition: the forgotten "child" of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med*, 2004;49(1):19-23.
27. Bankowski BJ, Lyster AD, Faden RR, Wallach EE. The social implications of embryo cryopreservation. *Fertil Steril*, 2005;84(4):823-832.
28. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 2008;90(1):186-193.
29. Sifer C, Sermondade N, Dupont C, Poncelet C, Cédric-Durnerin I, Hugues JN, Benzacken B, Levy R. Outcome of embryo vitrification compared to slow freezing process at early cleavage stages. Report of the first French birth. *Gynecol Obstet Fertil*, 2012;40(3):158-161.
30. Bisioli C, Valcarcel A, Tiverón M, Quintana R, Sojo E, Sueldo C, 2003. Better embryo quality and reproductive performance using sequential media in day 3 transfers. 59th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. San Antonio, Texas, Florida (EE.UU.), del 11 al 15 de octubre de 2003. *Fertil Steril* 80, (Supl 3) : O-151.
31. Borman E, Check JH. A comparison of clinical pregnancy rates and multiple gestation rates with 2 vs 3 embryos transferred with pairs matched for embryo quality. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2013;40(2):196-197.
32. Umranikar A, Parmar D, Davies S, Fountain S. Multiple births following in vitro fertilization treatment: redefining success. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013;170(2):299-304.
33. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod*, 2005;20(1):185-190.
34. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online*, 2008;16(6):835-841.
35. Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP, Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril*, 2008;90(1):104-112.
36. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 2010;93(3):807-813.
37. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online*, 2007;14(5):650-663.
38. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Taraborrelli S, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M. Comparison of two ready-to-use systems designed for sperm-hyaluronic acid binding selection before intracytoplasmic sperm injection: PICSi vs. Sperm Slow: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril*, 2012;98(3):632-637.
39. Hoogendijk CF, Kruger TF, Bouic PJ, Henkel RR. A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertil Steril*, 2009;91(4):1285-1292.

40. Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedó C, Carro M, Papier S, Nodar F. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online*, 2010;20(3):320-323.
41. Avendaño C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril*, 2010;94(2):549-557.
42. Grunewald S, Paasch U. Sperm selection for ICSI using annexin V. *Methods Mol Biol*, 2013;927:257-262.
43. Montjean D, Belloc S, Benkhalifa M, Dalleac A, Ménéz Y. Sperm vacuoles are linked to capacitation and acrosomal status. *Hum Reprod*, 2012;27(10):2927-2932.
44. Lo Monte G, Murisier F, Piva I, Germond M, Marci R. Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini-review. *Asian J Androl*, 2013;15(5):608-615.
45. Sakkas D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 2013;99(4):1023-1029.
46. Debe M, Suarez L, Isa LM, Auge LM, Castro A, Valcarcel A. Resultados reproductivos en pacientes infértiles por el uso de columnas de anexina V para la selección de espermatozoides no apoptóticos. *Fertilidad (Buenos Aires)*, 2013;IX (1):29.
47. Guidobono ML, Tiveron M, Auge LM, Zappacosta Villarroel MP, Valcarcel A. Implementación de un desarrollo tecnológico en medicina reproductiva. El modelo de la vitrificación de oocitos humanos. *Fertilidad*, 2013;IX (1):15-28.
48. Jones Jr HW, Veeck LL, Muasher SJ. Cryopreservation: the problem of evaluation. *Hum Reprod*, 1995;10:2136-2138.
49. Jones Jr HW, Jones D, Kolm P. Cryopreservation: a simplified method of evaluation. *Human Reprod*, 1997;12:548-553.



HALITUS
INSTITUTO MÉDICO
"En el inicio de la vida y después..."
Dir. Méd. Dr. R. Sergio Pásqualini

"En el inicio de la vida y después..."

» **DEPARTAMENTOS MÉDICOS**

GINECOLOGÍA | OBSTETRICIA | ESTERILIDAD Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA | LABORATORIO ESPECIALIZADO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA
DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE PREIMPLANTACIÓN - DGP- | HEMATOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN | PATOLOGÍA MAMARIA
PATOLOGÍA CERVICAL | GINECOLOGÍA INFANTO JUVENIL Y PROCREACIÓN RESPONSABLE | UROGINECOLOGÍA | ENDOSCOPIA GINECOLÓGICA
DISFUNCIONES SEXUALES FEMENINAS | DISFUNCIONES SEXUALES MASCULINAS | ANDROLOGÍA | UROLOGÍA | GENÉTICA | NUTRICIÓN
EMBOLIZACIÓN Y TERAPÉUTICA ENDOVASCULAR | PSICOLOGÍA | ECOGRAFÍA, ECODOPPLER Y ECOGRAFÍA 4D
CLIMATERIO, MENOPAUSIA Y OSTEOPOROSIS | DERMATOLOGÍA Y ESTÉTICA

| WWW.HALITUS.COM | 5273-2000 CONTACT CENTER | MARCELO T. DE ALVEAR 2084 - CP1122 - Bs As - ARGENTINA |