

# Situación actual de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): Principales dilemas éticos.

**P.J. Sánchez Abad; L.M. Pastor y  
M. Sánchez Abad.**

*Departamento de Biología Celular (Master de Bioética). Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. Centro de Investigación y Formación en Bioética de Murcia.*

## 1. Introducción

Desde los primeros ensayos de inseminación artificial la gran mayoría de los investigadores relacionados con la reproducción humana han dirigido sus estudios a salvar las dificultades que, por diversas causas, convertirían a una pareja en infértil. En las últimas décadas han proliferado una serie de técnicas que van superando y sustituyendo las deficiencias reproductivas de las parejas que desean tener un hijo. La aparición de una nueva técnica de reproducción asistida supone el salvar algún tipo de inconveniente con respecto a la anterior. Sin tener en cuenta el coste en embriones o los porcentajes de éxito de dichas técnicas; la gama de parejas con problemas para la consecución de un hijo se va reduciendo. A pesar de esto, una considerable proporción de parejas infértiles (en las que el varón ofrece pobres parámetros en la calidad del semen) no veían solución a su problema. La ICSI y sus variantes, que en este artículo se analizan, han venido a abrir según sus promotores una vía de esperanza en estas parejas.

Según ellos la posibilidad de fertilización aún con semen de bajísima calidad e incluso

con gametos masculinos en etapas de desarrollo anteriores al espermatozoide, supone romper una de las barreras más grandes contra la infertilidad. Además, las perspectivas de la ICSI nos acercan a la posibilidad de solucionar todo tipo de infertilidad y evitar la fertilización heteróloga (más discutida desde el punto de vista ético).

Pero junto a esto, muchos pensamos que este tipo nuevo de FIVET nos aproxima a la reducción drástica de la fertilización -de hecho este fenómeno se convierte en una mera fusión de núcleos, salvando cualquier barrera de tipo natural- que puede facilitar el admitir con más facilidad la utilización de esta metodología en la inyección de genes en gametos y cigotos o en la realización de la clonación. Además, esta nueva técnica, parece poner más en evidencia que la conversión del deseo de tener un hijo en un derecho, conlleva una progresiva sustitución de los procesos biológicos por la técnica.

Por lo tanto, es intención de esta comunicación por un lado, analizar la ICSI y ver si sus tasas de éxito van en consonancia con las expectativas abiertas, y por otro, analizar desde el punto de vista ético los conflictos que plantea y hacer una valoración de ellos.

## 2. Repaso histórico

Hasta la fecha ni la inseminación artificial ni la fecundación in vitro se habían mostrado como técnicas exitosas a la hora de conseguir la fertilización en parejas en las que el varón no presentaba características idóneas en cuanto a su esperma. La barrera natural que supone la zona pelúcida era el mayor obstáculo para este esperma "pobre". La única ayuda que en el pasado se podía realizar era

la de aumentar la concentración de espermatozoides en la suspensión inseminada, la reducción del volumen del medio de inseminación o la utilización de medios mejorados de selección de espermatozoides<sup>1</sup>. De cualquier forma, los resultados, aunque medianamente positivos en casos de parámetros de espermatozoides moderadamente bajos, no mejoran cuando las características del semen son más deficientes (1).

Después de esto, se intentó la inserción del espermatozoide atacando, de diferentes formas, la zona pelúcida (quitándola totalmente, perforándola o ablandándola). El éxito de estos ensayos fue diferente y la polispermia y las dificultades en la posterior implantación del cigoto en el útero se veían aumentadas<sup>2</sup> (4). La inserción de espermatozoides directamente dentro del espacio perivitelino (SUZI), aunque parecía solventar los problemas de polispermia y de espermatozoides sin motilidad, no produjo resultados demasiado alentadores.

En este momento se comenzó a pensar en la inyección de un solo espermatozoide, con lo que, artificialmente, se superaría la barrera de la zona pelúcida se evitaría la polispermia y la posible no capacitación del espermatozoide, además de no hacer necesaria la reacción acrosómica. Los espermatozoides de baja calidad, parecerían normales al conservar, casi exclusivamente, su núcleo, que es lo único imprescindible a la hora de la fertilización.

La historia de la ICSI, comienza en 1962 con los experimentos que Hiramoto realizó en erizos de mar (5). En 1966 Lin realiza experimentos de inyección de espermatozoides de huevos de ratón, era la primera vez que esto se hacía en mamíferos (6). Los estudios y ensayos en animales sobre esta nueva técnica con-

tinuaron, aunque se producía una alta proporción de ovocitos dañados (7). La mayor experiencia y la mejora del instrumental con el que se realizaba la microinyección llevaron en 1988 a la consecución de descendencia en conejos (8). El éxito que se obtenía en el campo de la veterinaria hizo que se empezara a experimentar en el hombre en aquellos casos en que la calidad del espermatozoide estaba seriamente comprometida. Se comenzó por insertar espermatozoides humanos en ovocitos de hámster, observando que se producía la descondensación nuclear (9). Esto lo realizó Lanzendorf en 1988, y en ese mismo año sugirió la posibilidad de utilizar ovocitos humanos<sup>3</sup> (10). Desde ese momento se viene experimentando la ICSI con gametos humanos, pero la consecución de embarazos no llegó hasta 1992. En este año, en la Free University de Bruselas, mientras se aplicaba la técnica de SUZI, un espermatozoide penetró accidentalmente en el citoplasma de un ovocito y lo fertilizó. Se abrió, entonces, una línea de investigación para reproducir este evento y se llegó a la consecución de 4 embarazos<sup>4</sup> (11).

A partir de aquí, numerosos investigadores han seguido esta técnica. Para estos está dando resultados comparables a los alcanzados con otras técnicas que no utilizan semen de baja calidad (12). Esta posible independencia de la calidad del semen a la hora de conseguir embarazos, está haciendo de la ICSI una de las técnicas más utilizadas en la actualidad.

### 3. Técnica empleada en la actualidad<sup>5</sup>

Para la realización de este punto se han tomado como base las publicaciones de varios centros que realizan ICSI<sup>6</sup>, considera-

dos representativos de lo que se lleva a cabo hoy en día en todo el mundo en relación a esta técnica.

### 3.1. Método y materiales empleados

La ICSI es la inyección de un solo espermatozoide, previamente seleccionado, en el citoplasma de un oocito y se emplea en aquellas parejas en las que el semen del varón presenta parámetros de baja calidad, y en las que otras técnicas de FIVET han fracasado<sup>7</sup>. Presenta algunas variantes con respecto a lo inyectado (el espermatozoide entero o solo la cabeza; espermatozoide del eyaculado o de otra procedencia; o gameto masculino en grado de desarrollo inferior al espermatozoide) que se comentarán en otro punto.

#### a. Obtención y preparación del espermatozoide:

Las muestras de semen en fresco<sup>8</sup> utilizadas, se obtienen normalmente por masturbación<sup>9</sup>, después de al menos 3 días de abstinencia (12) y en el día de la recogida de los ovocitos. La muestra se deja licuar durante unos 20 minutos a 37° C después de su emisión y antes del análisis<sup>10</sup> de sus parámetros (13). El espermatozoide recogido se diluye en un medio de fluido tubárico (HTF) y se centrifuga en gradientes de Percoll (12, 13), que elimina el plasma seminal y selecciona los mejores espermatozoides (4). La suspensión final se incuba a 37° C en una atmósfera cuyo aire contiene el 5% de CO<sub>2</sub> (12).

#### b. Obtención y preparación de los ovocitos:

La mujer se somete a un tratamiento de estimulación ovárica por hMG (gonadotropina de mujeres menopaúsicas) (12, 14). Para dejar libre los ovocitos de las células del cúmulus con las que son recuperados, se

exponen a hialuronidasa contenida en un medio HTE, durante unos 3 minutos (12). Por último, los ovocitos son aspirados mediante pipetas Pasteur y lavados con medio HTF suplementado un 10% de suero de la paciente (12, 13). Posteriormente se examina su grado de madurez, y se eligen los más adecuados para ser inyectados (aquellos que han expulsado el segundo corpúsculo polar, ya que estarán en disposición de fusionar los pronúcleos) (12, 13, 14).

#### c. Inyección del espermatozoide en el ovocito:

Para la inyección del espermatozoide se necesita un material apropiado, que consiste en una serie de pipetas (de sujeción del ovocito e inyección del espermatozoide)<sup>11</sup> incorporadas a un microscopio invertido<sup>12</sup> y placas Petri (15).

En el centro de la placa se deposita 1 µL de la suspensión del espermatozoide con 4 µL de medio HTE, con un 10% de Polivinilpirrolidona (PVP). Cada ovocito se sitúa en una gotita de 5 µL de medio [cubiertas con aceite de parafina para evitar su evaporación (14)], rodeando a la gota central de espermatozoide con PVP (se suelen disponer 8 gotas) (12, 13, 14, 15). Se selecciona un espermatozoide con la ayuda del microscopio<sup>13</sup>, se aspira con la pipeta de inyección (primero se introduce la cola) y se procede, con sumo cuidado, a la inyección dentro del citoplasma del ovocito, repitiendo esta operación en cada una de las gotas con ovocitos que rodean a la central (12, 13, 14, 15). Este último, el ovocito, estará sujeto con la pipeta de sujeción que ejerce sobre él una leve succión y con el corpúsculo polar en posición 12 en punto y apoyado en el fondo de la placa Petri (con lo que se mejora la sujeción) (15)<sup>14</sup>.

#### **d. Control de la fertilización y división del embrión:**

Después de 12-17 h, se hace un primer control de la integridad del ovocito y del número y tamaño de los pronúcleos formados. A las 24 h de la fertilización se evalúa el estado del ovocito (si ha habido lisis, o no) y su división en caso de fertilización (número y tamaño de los blastómeros) (12, 13). Unos tres días después de la inyección, aquellos embriones que, por su morfología, se consideren más adecuados, son trasferidos dentro de la cavidad uterina, en medio HTF con el 75% de suero de la paciente (12, 13, 15)<sup>15</sup>.

#### **3.2 Variantes de la ICSI**

La infertilidad masculina conlleva que el eyaculado tenga o parámetros seminales pobres o que exista una ausencia total de espermatozoides<sup>16</sup>. La causa de esta segunda anomalía puede deberse a la obstrucción de alguna parte del tracto genital masculino o a una deficiencia en la espermatogénesis. La ICSI que se ha descrito se relaciona con el primer tipo de infertilidad y fue la que primero fue puesta a punto. Esta es aplicable a pacientes que, aunque muy pocos, tengan espermatozoides en el eyaculado. Posteriormente se han desarrollado algunas variantes, estas se salen del esquema anterior, aunque lo único que las diferencia es que el espermatozoide no va a proceder del eyaculado, o que lo que se va a inyectar son espermátidas e incluso espermatoцитos secundarios. Así pues, cuando no se pueden obtener espermatozoides del eyaculado y hay obstrucción, se obtienen de los testículos (17) o del epidídimo mediante biopsia (18)<sup>17</sup>. En los casos en que hay anomalías en la espermatogénesis, se ha llevado a

cabo la inyección de espermátidas (18, 19) y se está experimentando también con espermatoцитos secundarios (20).

#### **4. Riesgos y anomalías en la ICSI y sus variantes<sup>18</sup>**

Sin entrar a valorar todavía los resultados de la ICSI y sus variantes, es evidente que estas técnicas han conseguido embarazos con gametos procedentes de parejas con infertilidad de origen masculino. Ahora bien uno de los inconvenientes más aducidos en la literatura es que estos procedimientos no están exentos de riesgos y pueden llevar consigo anomalías, tanto en el proceso de desarrollo del embrión, como en los niños que vayan a nacer. Estos pueden ser:

**a) Relacionados con la propia técnica:** Suele indicarse que lo primero que hay que tener en cuenta son las manipulaciones a las que se somete al ovocito que va a ser inyectado. Este es: extraído después de estimulación hormonal<sup>19</sup>; expuesto, al prepararlo, a agentes que pueden dañarlo (hialuronidasa, luz intensa, cambios de temperatura)<sup>20</sup>; y por último, se le hace una brecha artificial en la zona pelúcida y en el oolema (pueden introducirse toxinas y escombros en el espacio perivitelino y en el ovoplasma)<sup>21</sup>. Todo esto, además de dañar al ovocito e impedir el desarrollo del embrión, puede llevar consigo malformaciones congénitas y anomalías cromosómicas (1, 21, 22, 23).

**b) Genéticos:** Por otra parte, está la preocupación de transmitir defectos genéticos o producir embriones inviábiles por la inyección de espermatozoides con anomalías en los cromosomas. Lo primero puede ocurrir al ser empleadas estas técnicas en pacien-

tes con deficiencias en el esperma, es que algunas de ellas se podrían transmitir de ser hereditarias. Si estas deficiencias, efectivamente, suponen defectos en el genoma, la ICSI estaría incrementando la probabilidad de transmitirlos a la descendencia, ya que, la utilización de unos cuantos espermatozoides, que normalmente no fecundarían el óvulo, evita la selección de los mejores por las barreras biológicas<sup>22</sup>.

Con respecto a la cuestión genética, R.G. Edwards en un reciente artículo (25) centra estos riesgos de la ICSI en tres frentes: uno es el alto riesgo aparente de trisomías en los cromosomas sexuales de los embriones obtenidos mediante esta técnica, debido probablemente a mosaicismo para estas trisomías en algunas líneas de las células germinales de las gónadas de los pacientes tratados (26); otro es la posibilidad de que un individuo portador de una enfermedad hereditaria y que normalmente sería infértil, al someterlo a la ICSI transmita dicha enfermedad (27) (por ejemplo la fibrosis quística<sup>23</sup>); por último, se ha observado que en pacientes con severa oligozoospermia se producen muchas deleciones en el cromosoma Y, que también se transmitirían (28). Ahora bien, existen trabajos que comparan estas anomalías a las producidas en la FIVET y con la reproducción natural y las proporciones son parecidas (25, 29, 30). El debate sigue todavía abierto.

Otra fuente de riesgos y posibles anomalías es la inserción dentro del ovocito de espermátidas, espermatoцитos secundarios y núcleos desnudos de ambas células germinales masculinas. Por ser la línea por donde parecen discurrir las investigaciones más

avanzadas en este campo, las tratamos seguidamente con más amplitud.

#### **a. Uso de espermátidas y espermatoцитos en microinyección (18,31).**

Los cambios sufridos en la espermiogénesis, tienen como fin principal dotar a la célula germinal masculina de las especializaciones necesarias para alcanzar y penetrar el ovocito<sup>21</sup>. Cuando esta falla se produce la azoospermia. En estos casos, es cuando se utilizan las espermátidas para la fecundación. En 1996 ya habían nacido tres niños utilizando este tipo de gametos<sup>25</sup>. A pesar de estos éxitos, la experimentación en el hombre y los posibles riesgos que acompañan a estas prácticas de inyección de espermátidas, no están claramente definidos ni controlados (16).

El hecho de que un paciente necesite de la extracción de espermátidas se debe a que, por alguna causa, no fabrica espermatozoides. Si este defecto se heredara, estaríamos transmitiendo dicha enfermedad<sup>26</sup>. Por otro lado, es obligado el preguntarnos si, además del material genético, las espermátidas del paciente contienen todos los elementos necesarios para el normal desarrollo del embrión, ya que si la espermatogénesis está afectada, podría haber también mala transmisión de determinadas "marcas genómicas" (marca parental) que determinan la expresión de ciertos genes<sup>27</sup> lo que estaría provocando otra patología<sup>28</sup>. En el hombre, todos los genes que tienen un papel crítico en el desarrollo están ya impresos en la fase de espermátida, pero, es posible que la marca de ciertos genes esté todavía incompleta en dicha fase<sup>29</sup> (16). Saber si un paciente con azoospermia no obstructiva ha llegado a producir espermatozoides alguna vez, despejaría la incógnita de que si

su enfermedad es o no hereditaria. Para algunos autores esto eliminaría todo tipo de prevenciones en el uso de esta técnica.

Todo lo que se acaba de comentar para las espermátidas en cuanto a los riesgos, se podría decir para la experimentación con espermatoцитos secundarios. Hoy en día, se ha conseguido descendencia utilizándolos en ratón (20), pero todavía no en el hombre.

#### **b. Uso de núcleos desnudos en microinyección (35).**

También en este caso, los riesgos son los mismo, pero al inyectar solo el núcleo, excluimos completamente toda otra aportación paterna que no sea el genoma. En este caso se plantea el problema de que los factores epigenéticos no se transmitan, como el factor de activación del ovocito (34), o también, ni siquiera el centrosoma paterno que es el responsable en el hombre de la organización de los microtúbulos en el futuro embrión (16). Ante esto, los investigadores piensan que para superar estos escollos y prevenir posibles riesgos es imprescindible un examen genético del varón y un seguimiento estricto de los niños nacidos mediante estas técnicas, para conocer con certeza su potencial patológico.

### **5. Eficacia y valoración de resultados de la ICSI en la literatura reciente.**

#### **5.1. Análisis cualitativo:**

Lo que encontramos en la literatura consultada con respecto a la eficacia de la ICSI en las distintas patologías para la que está indicada es lo siguiente:

a. En el caso de esperma con parámetros pobres, Nagy y col. (29) publicaron en 1995 un amplio estudio sobre la influencia de la

oligo, asteno y teratozoospermia en los resultados de la ICSI, concluyendo que, aún en casos extremos de estas patologías, se obtienen altas tasas de fertilización y embarazo. El criterio esencial para que la ICSI consiga fertilización es que existan espermatozoides móviles (vivos)<sup>31</sup>.

b. En los pacientes con azoospermias obstructivas, o no, pero con algún espermatozoide testicular, la ICSI ha conseguido descendencia. Devroey y col. en 1996, constatan este hecho, e indican que las tasas de fertilización e implantación fueron independientes del fallo de la espermatogénesis<sup>31</sup>, siempre y cuando fuera posible la obtención de espermatozoides de los testículos (36), o del epidídimo (12, 13).

c. La ICSI ha conseguido descendencia con espermátidas cuando no es posible obtener espermatozoides del testículo ni del epidídimo (con índice de éxitos muy bajo) (16).

#### **5.2. Análisis cuantitativo<sup>32</sup>:**

Mostramos a continuación datos de diferentes centros que han realizado técnicas de inyección y que pensamos son adecuados para la realización de este análisis.

Haciendo promedios según los datos expresados en la tabla podemos constatar que:

- La eficacia de la inyección con respecto a ovocitos obtenidos con 2 PN es del 63%.

- Hay un 7,7% de anomalías en las dotaciones cromosómicas después de la inyección.

- Solo el 45,3% de oocitos con 2 PN son utilizados como embriones a transferir.

- La tasa de implantación de los embriones transferidos es del 15,1%.

- El porcentaje de embarazos respecto a ovocitos con 2 PN es del 7,6%.

- La tasa de embarazos respecto a embriones obtenidos es del 9,5%.

- El porcentaje de embarazos continuados con respecto a ciclos de ICSI es del 37%.

Referencia-año	11-1995	13 - 1995	37- 1995	14 - 1994	38 - 1996	39 - 1996	40 -1995	16-1997
<b>Ciclos</b>	355	296	176	69	75	837	103	
<b>Oocitos inyectados</b>	2970	2858	1659	789	837	7156	797	
<b>2 Pronúcleos (PN)</b>	1917	1774	1057	410	506	4938	547	
% (a)	64,5	60	63,7	52	60	69	68,6	
<b>Otros (b)</b>	325	293	149	25	? (c)	701	10 (3PN)	
% (a)	11	12	9	3,2		9,8	1,3	
<b>Oocitos destruidos</b>	728	791	453	354	331 (c)	1517	240	
% (a)	24,5	28	27,3	44,2	40	21,2	30,1	
<b>Embriones</b>	1460	1613						27
% (d)	76,2	56,4						
<b>Embri. transf.</b>	1025	1093		181		2522	175	
<b>Embriones por ciclo</b>	3	?		?		3	2	
<b>Embarazos (e)</b>	191	103		29	48	457	24 (i)	
% (a) ; (f) ; (g)	6,4 13 54	3'6 6 35		3,7 ? 42	6 ? 65	6,4 ? 55	3 ? 23	
<b>Embaraz. continuad.</b>	137	57			44	368 (h)	18	3
% (a) ; (f) ; (g)	4,6 9,4 39	2 3,5 19			5,3 ? 59	5,1 ? 44	2,3 ? 18	? 11 ?
<b>Niños nacidos</b>	30 (j)							3
% (a) ; (f) ; (g)	? ? ?							? 11 ?

a) Porcentaje referido a oocitos inyectados.

(c) En el artículo no se especifica cuantos son oocitos destruidos y cuantos con dos PN. El 40% es de ambos.

(e) No se especifica cuantos de ellos son múltiples.

(g) Porcentaje referido a los ciclos realizados.

(i) Embarazos por transferencia de embriones.

(b) Se incluyen todos los que no han presentado 2 PN.

(d) Porcentaje referido a oocitos con 2 PN.

(f) Porcentaje referido a embriones obtenidos.

(h) De los 368, 161 fueron embarazos múltiples.

(j) Nacimientos hasta la fecha de salida del artículo.

De los trabajos utilizados para esta comunicación no se pueden extraer conclusiones con respecto a los niños nacidos, debido a la escasez de datos. Existe un estudio de los niños nacidos mediante la ICSI, pero sin datos referentes al proceso de la inyección, en el que U.B. Wennerholm y col. (1996) (41),

concluyen que: la frecuencia de complicaciones prenatales, de nacimientos múltiples, de partos prematuros entre los embarazos simples, al igual que el peso de los niños al nacer, es baja, comparada con otros estudios hechos para la FIV standard. El número de malformaciones congénitas mayores no

incrementa en comparación con la población general<sup>33</sup>. Con respecto a las malformaciones congénitas, también en 1996, M. Bonduelle y cols (30), realizaron un seguimiento de 423 niños nacidos mediante ICSI, en este trabajo, la tasa de malformaciones congénitas mayores fue del 3,3% . Esta cifra según otros autores puede ser mayor y alcanzar el 7,4% si se emplea una definición correcta de malformaciones mayores. En todo caso la tasa es mayor que la observada en la FIVET (2%)<sup>34</sup>.

## 6. Consideraciones éticas

### 6.1. Aspectos éticos tratados en la literatura

En los trabajos estudiados al respecto, encontramos **el problema de la transmisión de anomalías cromosómicas** como único punto que es tenido en cuenta a la hora de plantearse las consideraciones éticas con respecto a esta técnica.

En numerosos artículos (12, 13, 15, 32, 37) se plantea el debate referido solamente a cuestiones **técnicas sobre la mejor utilización o aplicación de los diversos procedimientos** que comprende la ICSI. Pero, como decíamos, la posibilidad de que al utilizar espermatozoides "pobres" o gametos masculinos no totalmente desarrollados, se transmitan defectos a la descendencia, es la preocupación fundamental que emana de la bibliografía consultada. Al tratar este problema, se hace desde dos puntos de vista que seguidamente abordamos:

**a. ¿Están los procesos biológicos que la ICSI invade** (activación del ovocito, reacción acrosómica, utilización de espermatozoides de individuos con patologías reproductivas,...) **lo suficientemente estudiados y comprendidos**, y

la técnica lo suficientemente depurada como para que se puedan controlar la transmisión de deficiencias a la posible descendencia y pasemos (como estamos observando) de utilizar la ICSI como una técnica experimental a utilizarla como un procedimiento de empleo rutinario en parejas infértiles?

La falta de investigación animal (16, 42), los porcentajes de eficacia de la fertilización por micromanipulación (véase punto 5) y la cantidad de estudios publicados con respecto a la utilización de esta técnica, hacen pensar que se esté yendo demasiado deprisa en lo referente a la implantación de la ICSI (42).

**b. ¿Hasta qué punto una pareja infértil tiene derecho a tener un hijo si ello implica la transmisión de deficiencias?**

En literatura sobre la ICSI existe unido al punto **a** un debate sobre el derecho de las parejas infértiles a ser ayudadas si hay posibilidad de transmitir anomalías a la descendencia. El saber sobre quién recae la responsabilidad de traer al mundo individuos enfermos o con deficiencias, el coste económico que esto supondría y los derechos de la descendencia que no ha sido consultada, son cuestiones que se derivan de lo anterior.

Se plantea, entonces, para muchos autores el tratar de equilibrar los beneficios (mejor comprensión de los procesos que acompañan a la reproducción, parejas que pueden ver cumplido su "deseo-derecho" de conseguir un hijo mediante esta técnica) y los daños (transmisión de anomalías). Para ello se ofrecen las siguientes recomendaciones: 1- estudio genético de los padres, 2- parámetros mínimos que debe cumplir el semen utilizado, 3- restricción de las parejas que se puedan someter a la ICSI basada en los dos pun-

tos anteriores, 4- consentimiento informado de los padres con explicación clara del procedimiento, de su naturaleza experimental y sus posibles resultados negativos, 5- seguimiento pediátrico e investigación continuada de los niños nacidos mediante esta técnica, 6- incremento de la investigación, 7- estudio del problema por un equipo de profesionales que abarquen otros campos distintos al de la medicina (éticos, legisladores y comunidad no experta) (42).

Probablemente el boom que ha supuesto la consecución, en ciertos casos, de descendencia a través de la ICSI en la comunidad científica y en la sociedad en general, esté empujando al empleo extensivo y excesivo de esta técnica sin una evaluación detenida de las posibles consecuencias que derivan de la invasión en los procesos biológicos que implica su utilización.

## 6.2. Análisis bioético

Son tres los aspectos a tratar a la hora de hacer un análisis bioético que ayude a determinar la licitud o ilicitud de esta nueva variante de las técnicas de reproducción asistida: por un lado se trata de considerar la técnica en sí misma, por otro de estudiar las consecuencias que se derivan de su puesta en práctica, y por último, de analizar la finalidad subjetiva de los profesionales que la realizan y de los pacientes que se someten a ella.

a. Con respecto a **la valoración ética de la técnica en sí misma**, es evidente que ésta va a depender del valor que se le de a la persona y a lo que significa dar vida a un nuevo ser humano. Pensamos que una persona es un fin en sí misma y su dignidad tiene que corresponderse con un origen que esté a la altura de ella. Es decir, su puesta en existen-

cia debe ser consecuencia de un acto libre de donación mutua de otras dos personas donde lo biológico es consustancial a lo amoroso. A esto denominamos procreación. Su fruto es **un nuevo ser humano que no es causado a través de la pericia técnica como si fuera un objeto de producción**, sino emerge como un don que responde al don realizado por sus padres en la entrega sexual. La mayoría de las técnicas de reproducción asistida vulneran esta realidad, pues, separando la parte unitiva de la biológica, sustituyen el acto sexual que es un "encuentro biológico personal que da origen a otro ser humano personal" (43). Se obliga de esta forma al nacido a ser fruto de intenciones remotas amorosas de los padres y de las acciones próximas de los profesionales fecundadores.

Desde esta visión, la ICSI requiere, desde el punto de vista bioético, como decíamos, la misma consideración que la FIVET, pero pensamos que la primera introduce un nuevo nivel de debate, ya que, si con la FIVET se "respetaba", al menos, el fenómeno mismo de la fecundación (la selección natural del espermatozoide por las barreras biológicas del ovocito, la propia penetración de este y la subsiguiente singamia), la ICSI rompe drásticamente con todo esto (el espermatozoide es "elegido" por el operador, la ruptura de las barreras es artificial y el mecanismo de activación del ovocito que culminará con la singamia también es alterado). Vemos, pues, que **esta técnica es mucho más invasiva y que, además de romper el conjunto unitivo-procreativo que significa la concepción de un nuevo ser, como lo hacen la mayoría de las TRA, invade la única parte biológica que las demás aún respetaban: la fecunda-**

ción. Se termina, pues, de mecanizar todo el proceso. Estamos ante un nuevo hecho reproductivo que podríamos llamar **tecnofecundación**. Este nuevo hecho a nuestro entender se encuentra implícito en la estructura misma de la FIVET. La ICSI es una variante de esta que lleva a término de modo radical los presupuestos existentes en la primera. En concreto **se hace más explícita la conversión de la procreación bajo el dominio del logos técnico en un quehacer tecnológico que suplanta al auténtico y pleno amor humano**. Como consecuencia de ello **el embrión es radicalmente cosificado y convertido en un mero objeto de producción**.

b. Por otra parte, la puesta en práctica de esta **tecnofecundación conlleva una serie de consecuencias directas e indirectas que están haciendo aumentar el dominio sobre el proceso de fecundación e incrementando la manipulación sobre el ser humano**:

En primer lugar, y como decíamos en el apartado anterior, la excesiva y extensiva aplicación de la ICSI ha producido, al igual que la FIVET, una alta tasa de embriones perdidos. Vista la tabla del apartado 5.2, podemos comprobar que el "forzar" al espermatozoide a que fecunde el ovocito supone, que ya, desde el primer momento, el 35% de los intentos fracasen y no lleguen al estado de 2 PN para que pudieran seguir normalmente el proceso de fecundación. Del 65% restante, solo el 8,5% llega a contarse como embarazo<sup>34</sup>, lo que supone que nada más que el 5,5% (o el 11% en el mejor de los casos) de los "intentos forzados" de fecundación llegan a considerarse embarazos. De estos datos, junto con la escasez de ellos a la hora de realzar porcentajes con niños nacidos, se puede

concluir que la ICSI está, todavía, en proceso de experimentación y que esta se está haciendo a costa de perder embriones, los cuales, desde nuestro punto de vista, poseen la misma dignidad que una persona adulta y, por ello, el mismo derecho a ser tratados de la misma forma. A nuestro modo de ver, el argumento de que existe la posibilidad de que la ICSI pueda "desterrar" la fecundación heteróloga, queda deslegitimizado por el coste en embriones que supone.

En segundo lugar, la evolución de la práctica de esta técnica la ha llevado, al querer salvar los problemas que la mala adecuación de los gametos masculinos suponía para la fecundación, a la introducción de núcleos desnudos de espermatozoides y espermátidas, lo que nos aproxima ciertamente a la clonación. Si se generaliza una fecundación que solo es fusión de núcleos ¿como no admitir la introducción de un solo núcleo con las nuevas técnicas de microinyección que son comunes a la clonación de mamíferos?

En tercer lugar, la posibilidad de insertar un espermatozoide seleccionado con criterios de normalidad biológica priva del azar a la fecundación y puede sugerir la tentación de elegir un determinado espermatozoide para alcanzar el sexo deseado<sup>35</sup>. Por último, y en esta misma línea, solo le basta a esta tecnología de inserción de núcleos, añadir algún gen, para introducir una alteración en el genoma humano en la línea germinal que sea transmitida a la descendencia. Esta posibilidad no solo nos permite la terapia génica, sino otras posibles vías de intrusión en dicho genoma de carácter eugenésico.

c. El tercer aspecto que nos queda por analizar es el de **las intenciones subjetivas**.

No es nuestro interés emitir un juicio sobre ellas, sino, comprendiéndolas, no dejar de resaltar el estado experimental, aún precario, de la ICSI<sup>36</sup>, y junto con el empeño de defender el embrión humano y su dignidad y la consideración del acto sexual como única vía digna de ser concebido, concluir que "la honestidad del fin y la bondad de las intenciones subjetivas no bastan por sí solas para hacer ético el recurso de los medios que dispone la técnica biomédica" (43, 44).

Como consideración final, creemos que el centro del debate bioético se sitúa en el derecho, o no, a tener un hijo. Si efectivamente es un derecho, de alguna manera se está considerando al que va a nacer como objeto, si esto es así, toda ayuda que la biotecnología pueda aportar queda fuera de cualquier posible discusión. Pero, como decíamos al principio de este apartado, pensamos, que **el nacimiento de un nuevo ser humano, fin en sí mismo, debe ser consecuencia de un acto amoroso, libre, de completa donación en el plano corporal y espiritual de dos personas.** Este es el origen que consideramos concorde con su dignidad y se sustenta en el hecho de que el embrión la tiene desde el mismo momento en que, si no existieran complicaciones, se desarrollaría un nuevo ser humano (la fecundación). En conclusión la ICSI, además de romper en su base esta realidad (como la mayoría de las técnicas de reproducción asistida), supone un grado mayor de tecnificación de la procreación, en el que ahora es eliminado casi totalmente el proceso biológico. Si la FIVET tradicional había transformado la procreación en reproducción, la ICSI empieza a reducir, a ésta a

una mera manufactura operada principalmente por la habilidad de los fecundadores.

## Bibliografía

1. Los métodos más comúnmente aplicados han sido swim-up, migración gravedad, sedimentación y gradientes de albúmina o Percoll (1). El método de gradientes de Percoll con la variable hipertónica produce mejores resultados cuando se trata de semen patológico, como ocurre frecuentemente en la ICSI (2). Todos estos métodos, además de seleccionar los espermatozoides más móviles, lo hacen también con aquellos que tienen una mayor capacidad de penetración. El Instituto Valenciano de Medicina Reproductiva en el Cuaderno de Medicina Reproductiva dedicado a la inseminación artificial, señala al método de los gradientes de Percoll, como el que más y mejor recupera los sémenes oligo y astenozoospermicos (3).

2. La zona pelúcida protege al embrión preimplantatorio durante su desarrollo temprano (1).

3. Como se recoge en (1) pag. 902, en 1981 Thadani VM. ya experimentó con oocitos y espermatozoides humanos, pero él inyectó varios núcleos de esperma y no un espermatozoide solo como es el caso que estamos tratando de la ICSI.

4. En este experimento se utilizaron 47 oocitos: 38 sobrevivieron al procedimiento, 31 mostraron la formación de pronúcleo, de estos se implantaron 15 en el útero y se consiguieron 4 embarazos, dos de gemelos y dos simples. De estos últimos se llegó al parto de dos niños sanos y de los embarazos dobles nacieron un niño de cada uno (1).

5. Como el objetivo principal de esta comunicación es el debate ético de la ICSI, no profundizaremos en su descripción, aunque la síntesis que se ha realizado abarca todos los aspectos de esta técnica.

6. Los centros de referencia son: Centro de Medicina Reproductiva e infertilidad del Hospital Cornell de Nueva York. Unidad de Biología reproductiva del Real Hospital de Mujeres en Victoria, Australia. Hospital Reina Isabel en Woodville, Australia. Centro de Ginecología y fertilidad de Londres. Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Sahlgrenska y el Centro de Fertilidad de Escandinavia, Universidad de Göteborg, Suecia.

7. Todavía no existen unas indicaciones standard para seleccionar las parejas tratadas con la ICSI, aunque

las ya citadas sean las que se siguen en la mayoría de los centros (1).

8. Aunque también se realiza con esperma crioconservado (13).

9. Posibles causas patológicas o de otro tipo, pueden aconsejar la recogida del semen por otros métodos, o puede estar recomendado el empleo de esperma epididimal o de gametos masculinos en otro estado de desarrollo (13, 16).

10. La evaluación del esperma se realiza, normalmente, de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (14), como ocurre en el centro de Ginecología y Fertilidad de Londres, aunque otros siguen sus propios parámetros (1).

11. La pipeta de sujeción del oocito tiene un diámetro interno de 20  $\mu\text{m}$  y externo de 60  $\mu\text{m}$ , tiene la punta roma para no dañar al gameto femenino. Las dimensiones de los diámetros interno y externo de la pipeta de aspiración e inyección del espermatozoide son, respectivamente, 5 y 6  $\mu\text{m}$ , y su parte final está cortada con un ángulo de 30° (15). Con la pipeta de inyección se separaba el tallo para reducir el tamaño de la célula a insertar, pero esto desplaza la membrana acrosomal y causa una parcial desmembración de la cabeza del esperma, que es necesaria para la decondensación del núcleo (ahora ya no se hace).

12. Este microscopio tiene una cámara caliente, donde se realiza todo el proceso de la inyección.

13. Los gametos inmovilizados por presión de la cola contra el fondo de la placa, parecen actuar mejor que los aún móviles [esto no está todavía demostrado (1)].

14. Todas estas operaciones requieren un manejo experto, ya que fácilmente se puede producir la rotura y lisis del oocito (1, 15).

15. Normalmente se transfieren dos embriones, para evitar posibles embarazos múltiples, aunque este número puede variar dependiendo de la edad de la paciente [2 ó 3 embriones si es menor de 30 años y 4 si es mayor (12)] (12, 13, 15).

16. Eyaculado con esperma pobre: oligozoospermia (disminución del número total de espermatozoides); astenozoospermia (reducción del número de espermatozoides móviles); teratozoospermia (disminución del número de formas normales). La ausencia total de espermatozoides en el eyaculado es la azoospermia.

17. En las azoospermias obstructivas se puede recuperar el esperma de los testículos (si la obstrucción está después). En las no obstructivas se han conseguido fertilizaciones también con esperma testicular (17), aunque en este tipo de azoospermias lo más habitual es que no se produzcan espermatozoides.

18. En cuanto a este punto y con respecto a los riesgos genéticos, Begoña Aran del Servicio de Medicina de la Reproducción del Institut Universitari Dexeus, es de la opinión de que la experimentación realizada hasta la fecha en este campo es insuficiente para conocer el verdadero riesgo del empleo de la ICSI. En esta comunicación se analizarán las incertidumbre y dudas que hay en este campo.

19. Cuando se eleva mucho las concentraciones de la hormona estimulante del folículo, la incidencia de anomalías cromosómicas aumenta (21).

20. Palermo y sus colaboradores (1) cuentan con la posibilidad de dañar al oocito de esta manera. El equipo de Baschat dice que las manipulaciones hechas a los gametos en la ICSI no les producen anomalías cromosómicas, solo admiten dudas en el caso de aneuploidías en los cromosomas sexuales (24).

21. La inyección puede provocar la activación del oocito, debido a un factor intrínseco del esperma (probablemente la descarga de enzimas acrosomales) y no a una mayor concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , como se pensaba (1). Se ha propuesto la inyección de esperma acrosómicamente reaccionado para evitar posibles distorsiones en la activación que estos factores pudieran causar (ya que lo harían al reaccionar con la zona pelúcida)(1). Robert G. Edwards, señala una serie de potenciales desórdenes en el ciclo celular después de realizar la ICSI, como por ejemplo, retraso en la expulsión del segundo cuerpo polar, asincrónica formación de los pronúcleos, aparición de un tercer pronúcleo, etc (23). Aún quedan aspectos no muy claros con respecto al proceso de activación (25).

22. Tanto en las azoospermias obstructivas, en la producción de espermatozoides anormales con espermatogénesis normal (espermatozoides sin acrosoma), en la hipoespermatogénesis o en la detención del desarrollo de las células germinales, parecen estar implicados genes, por lo que el uso espermatozoides en estos casos mediante ICSI supondría la transmisión de este grupo de enfermedades (32).

23. Se ha demostrado que el gen que causa la ausencia congénita de vasos deferentes (tendríamos una azoospermia obstructiva) está ligado a la fibrosis quística.

24. La espermiogénesis consiste en: a) formación del acrosoma (con enzimas que ayudan a la penetración del oocito y las capas que lo rodean); b) condensación del núcleo; c) formación del cuello, pieza intermedia y cola; d) eliminación de la mayor parte del citoplasma (32).

25. El primer ensayo clínico con espermátidas humanas se realizó en 1995 por Pierre Vanderzwalmen y col. en Bélgica. La espermátida fue recogida por biopsia testicular y, aunque se produjo fecundación, el embrión no llegó a su término. Un equipo internacional (Japón, Estados Unidos y Grecia, cuyos responsables fueron Tesarik, J. y Mendoza, C.) consiguió, también en 1995, el nacimiento de los dos primeros niños (varones) utilizando espermátidas redondas tomadas del eyaculado. Un año más tarde, Fishel, S. y col. lograron el tercer niño de una espermátide alargada tomada por biopsia testicular (16). Todos estos trabajos han tenido como base los realizados en animales por el equipo de Yanagimachi en 1994 (33).

26. Muchos problemas de espermatogénesis se manifiestan en anomalías genéticas (16) [muchas deleciones en el brazo largo del cromosoma Y se asocian a una azoospermia, aunque se produzcan espermátides (34)].

27. Las marcas genómicas se piensa que son determinadas proteínas histónicas que en algún momento del desarrollo se unen a los cromosomas, determinando la expresión de ciertos genes. El fallo en la espermatogénesis podría suponer la inadecuada ausencia o presencia de estas marcas, lo que conllevaría a la inapropiada expresión, o no, de los genes que regulan.

28. De todas formas hay autores que consideran que el riesgo es mínimo, ya que la ausencia de marca genómica se considera incompatible con el desarrollo del feto hasta su término. Los embriones conseguidos serían eliminados por la naturaleza antes de nacer (16).

29. En el ratón, algunas modificaciones relacionadas con la marca genómica no están terminadas al final del desarrollo de los espermatozoides en el testículo, sino que prosiguen durante el paso por el epidídimo (34). Esto también habría que tenerlo en cuenta a la hora de la extracción testicular de espermatozoides.

30. El parámetro que más independiente se muestra del éxito de la ICSI, es el de la morfología del espermatozoide (la calidad del embrión y la pérdida inicial de embarazos es la misma, según este estudio, que cuando se utiliza espermatozoide morfológicamente normal, luego se podría descartar, siempre según este artículo, que la anomalía en

la morfología implica anomalía genética). Estos resultados están apoyados también por Bourne y col. (1995) (37). Por tanto se deduce que el hecho de que con la ICSI se esté en disposición de elegir el mejor espermatozoide para la inyección, hace que, de muestras de espermatozoides en número de espermatozoides, movilidad y formas normales, podamos elegir el que esté en mejor estado para fertilizar al oocito. De esto mismo se desprende que esta técnica sea más eficaz que la FIV en estos casos (29).

31. En el artículo de Devroey y col (1996) (36), se señala que solo la edad de la mujer es factor limitante de la consecución de embarazos (en mujeres de edad >40 años). Al recoger espermatozoides del epidídimo, Palermo y col, y Bourne y col (1995), señalan un incremento en la efectividad de la ICSI (12, 13).

32. Según se desprende de toda la bibliografía consultada, el logro mayor de la ICSI es hacer independiente el éxito de la técnica de la "calidad" del espermatozoide (con las excepciones comentadas en el apartado anterior). Es por eso que en el siguiente cuadro solo se valoran los resultados en cuanto a la utilización de espermatozoides (sea cual sea su procedencia o su patología) y de espermátidas.

33. Pero debido al pequeño número de niños estudiados no se pueden extraer conclusiones demasiado fidedignas de las tasas de malformaciones congénitas.

34. *British Medical Journal* 14.XI.1997 y *Fertility and Sterility* 64 (1).1995. Assisted reproductive technology in the USA and Canada: 1993 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry.

34. No se especifica en todos los artículos cuantos son embarazos múltiples, luego, este porcentaje podría aumentar hasta el 16% de ser todos gemelos.

35. El peligro fundado de transmisión de enfermedades hereditarias, deja a la sola elección del médico y del paciente el seleccionar el sexo del futuro niño, ya que si se quiere evitar, por ejemplo, las posibles deleciones que se producen en el cromosoma Y en gametos de pacientes con severa oligozoospermia (28), bastaría con no seleccionar los gametos masculinos con este cromosoma para la inyección.

36. Los riesgos de la ICSI y todas las incertidumbres que existen con respecto a ella, están ya señalados en el punto 4 de esta comunicación y, en este apartado que estamos tratando, habría que tenerlas en cuenta.

## Referencias bibliográficas.

- 1- Palermo G.D. Cohen J. Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool overcome fertilization failure. *Fertil Steril* 6: 899-908. 1996
- 2- Velez de la Calle J.F. Human spermatozoa selection in improved discontinuous Percoll gradients. *Fertil Steril* 7: 737-742. 1991
- 3- Instituto Valenciano de Infertilidad. Cuaderno de Medicina Reproductiva. Inseminación Artificial, pags. 55-56. 1995
- 4- Yanagimachi R. Zona-Free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res* 10: 187-232. 1984
- 5- Hiramoto Y. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp Cell Res* 27: 416-426. 1962
- 6- Lin T.P. Microinjection of mouse eggs. *Science* 151: 333-337. 1966
- 7- Markert Ch. Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. *J Exp Zool* 228: 195-201. 1983
- 8- Hosoi Y. Miyake M. Utsumi K. Iritani A. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. Proc. 11th Int Congr Anim Reprod Artif Insem. 331. [Abstr]. 1988
- 9- Lanzerdorf S. Maloney M. Ackerman S. Acosta A. Hodgen G. Fertilizing potential of acrosome-defective sperm following microsurgical injection into eggs. *Gamete Res* 19: 329-337. 1988
- 10- Lanzerdorf S. E. Maloney M.K. Veeck L.L. Slusser J. Hodgen G.D. Rosenwaks Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* 49: 835-842. 1988
- 11- Palermo G.D., Joris H. Devroey P. Van Steirteghem A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 340: 17-18. 1992
- 12- Palermo G.D. Cohen J. Alikani M. Adler A. Rosenwaks Z. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev* 7: 211-218. 1995
- 13- Bourne H. Richings N. Harari O. Watkins W. Speirs A.L. Johnston W. I. H. Baker W.G. The use of intracytoplasmic sperm injection for the treatment of severe and extreme male infertility. *Reprod Fertil Dev* 7: 237-245. 1995
- 14- Tsigotis M. Yang D. Redgment C.J. Nicholson N. Pelekanos M. Craft I.L. Assisted fertilization intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Esteril* 62 (4): 781-784. 1994
- 15- Payne D. Intracytoplasmic sperm injection: Instrumentation and injection technique. *Reprod Fertil Dev* 7: 185-196. 1995
- 16- Tesarik J. La fecundación humana sin espermatozoides. *Mundo Científico* 178: 361-365. 1997
- 17- Kahraman S. Özgür S. Alatas C. Aksoy S. Tasdemir M. Nuhoglu A. Tasdemir Y. Balaban B. Biberoglu K. Schoysman R. Nijs M. Vanderzwalmen P. Fertility with testicular sperm extraction intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod*: 11 (4): 756-770. 1996
- 18- Ogura A. Yanagimachi R. Spermatids as male gametes. *Reprod. Fertil. Dev.* 155-159. 1995. Cuando cita a Silber S.J. The use of epididymal sperm in assisted reproduction. In "Frontiers in endocrinology. Vol. 8. Male factor in human infertility". (Ed. J. Tesarik.) pp. 335-68. (Ares Sero Symposia: Rome.) 1994
- 19- Vanderzwalmen P. *Hum Reprod.* 10: 502. 1995. Citado en: Tesarik J. La fecundación humana sin espermatozoides. *Mundo Científico* 178: 361-365. 1997
- 20- Kimura Y. Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injection with secondary spermatocyte nuclei. *Biology of Reprod.* 53: 855-862. 1995
- 21- Persson W.P. Peters G.B. Saunders D.M. Is ICSI associated with risks of genetic disease? Implications for counselling, practice and research. *Hum. Reprod.* 11 (5): 921-932. 1996
- 22- Miyake K. McNeil P.L. *Cell Biol.* 131: 1737. 1995. Citado en: Palermo G.D. Cohen J. Rosenwaks Z. Intra-cytoplasmic sperm injection: a powerful tool overcome fertilization failure. *Fertil Steril* 6: 899-908. 1996
- 23- Edwards R.G.. Cell cycle factor in the human oocyte and the ICSI. *Reprod Fertil Dev* 7: 143-153. 1995
- 24- Rosenbusch B. Sterzik K. Irregular chromosome segregation following ICSI? *Human Reprod* 11: 2337-2338. 1996

- 25- Edwards R.G. Recent scientific and medical advances in assisted human conception. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 255-262. 1997
- 26- Van Steirteghem A. Proceedings of the bourn. *Human Reprod. (suppl.)* (In press). Citado en: Edwards R.G. Recent scientific and medical advances in assisted human conception. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 255-262. 1997
- 27- Patrizio y col. 1993. Citado en: Edwards R.G. Recent scientific and medical advances in assisted human conception. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 255-262. 1997
- 28- Reijo R. Lee T-Y. Salo P. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein. *Nature Genet.* 10: 383-393. 1995
- 29- Nagy Z.P. Liu J. Joris H. Verhegen G. Tournaye H. Camus M. Derde M. Devroey P. Van Steirteghem A.C. The result of ICSI is not related to any the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 10 (5): 1123-1129. 1995
- 30- Bonduelle M. Legern J. Derde M-P. Buysse A. Wisanto A. Devroey P. Van Steirteghem, A.C. Liebars J. Comparative follow-up study of 130 children born after ICSI and 130 cildren born after IVF. *Hum. Reprod.* 10: 3327-3331. 1995. Y el posterior trabajo de estos mismos autores "Prospective follow-up study of 423 children after ICSI. *Hum Repro.* 11: 1996
- 31- Aitken R. J. Stewart Irvine D. Fertilization without sperm *Nature.* 379: 493-495. 1996
- 32- David M. de Kretser. The potential of intracytoplasmic sperm injection to transmit genetic defects causing male infertility. *Reprod Fertil Dev* 7: 137-142. 1995
- 33- Kimura Y. Yanagimachi R. Intracytoplasmic Sperm Injection in the mouse. *Biology of Reproduction* 52: 709-720. 1995
- 34- Kobayashi K. *Hum. Mol. Genet.*, 3: 1965. 1994. Citado en: Tesarik J. La fecundación humana sin espermatozoides. *Mundo Científico.* 178: 361-365. 1997
- 35- Kuretake S. Kimura Y. Hoshi K. Yanagimachi R. Fertilization and development of mouse oocytes injected whit isolated sperm heads. *Biology of reproduction* 55: 789-795. 1996
- 36- Devroey P. Nagy P. Tournaye H. Liu J. Silber S. Van Steirteghem A.C. Outcome of ICSI with testicular spermatozoa in obstructive and non obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 11 (5): 1015-1018. 1996
- 37- Bourne H. Richings N. Lui D.Y. Clarke G.N. Harari O. Gordon Baker H.W. Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results. *Reprod Fertil Dev* 7: 177-183. 1995
- 38- Schoolcraft W.B. Schlenker T. Adler A. Alikani M. A model for the incorporation of intracytoplasmic sperm injection into a private practice in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 65 (2): 258-261. 1996
- 39- Palermo G.D. Schlegel P.N. Colombero L.T. Zaninovic N. Moy F. Rosenwaks Z. Aggressive sperm immobilization prior to ICSI with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum Reprod* 11 (5): 1023-1029. 1996
- 40- Gordts S. Vercruyssen M. Roziers P. Bassil S. Demylle D. Donnez J. Campo R. Recents developments in assisted fertilization. *Hum Reprod* 10: 107-113. 1995
- 41- Wennerholm U.B. Bergh C. Hamberger L. Nilsson L. Reismer E. Wennergren M. Wikland M. Obstetric and perinatal outcome of pregnancies following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11 (5): 1113-1119. 1996
- 42- De Jonge C.J. Pierce J. ICSI - what kind of reproduction is being assisted? *Hum Reprod* 10: 2518-2528. 1995
- 43- Pastor L.M. Fecundación in vitro versus procreación. *Cuadernos de Bioética.* 21: 39-44. 1995
- 44- Sagrada congregación para la doctrina de la Fe. El respeto de la vida humana naciente y la dignidad de la procreación. 1987