



Técnicas de laboratorio de fertilización *in vitro*: avances y aplicaciones

In vitro fertilization laboratory techniques: advances and applications

Esperanza Carballo Mondragón,* Leonor Durán Monterrosas,† Elizabeth Cervantes Ibarra§

Resumen

Las técnicas de reproducción asistida (ART), que han tenido un desarrollo exponencial, no sólo por el desarrollo de más técnicas de tratamiento y diagnóstico, también a causa de que los medios de cultivo y los equipos evolucionaron para adaptarse a estos procedimientos y tienen un papel fundamental en el éxito de las técnicas de ART. Dentro de las técnicas que han marcado un cambio fundamental en ART, está el desarrollo de la técnica de ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) por Palermo y colaboradores (1993) quienes reportaron el primer nacimiento por esta técnica. En la actualidad, debido a la gran variedad de técnicas en fertilización *in vitro* (FIV), el laboratorio se divide en cuatro áreas principales: andrología, FIV, genética y criopreservación. Cada vez hay más avances en la tecnología en las técnicas FIV, las cuales ayudan a poder realizar mejores diagnósticos y tratamientos individualizados en los casos de infertilidad.

Palabras clave: Reproducción asistida, métodos de reproducción asistida.

Summary

Reproduction assisted techniques have had an exponential growth not only by the development of new treatments and diagnostic techniques but also equipment and culture media have adapted to this procedures and have a main part in its success. The development of the Intracytoplasmic sperm injection technique by Palermo et al (1993) made a great impact in reproductive techniques. Due to different IVF techniques, the laboratory divides in 4 main areas: Andrology, genetics, criopreservation and IVF. There are more and more advances in technology, which helps to make better diagnoses and individualized treatment.

Keywords: Assisted reproduction, methods for assisted reproduction.

INTRODUCCIÓN

El nacimiento de Louise Brown en 1978 fue el inicio de las técnicas de reproducción asistida (ART), que desde entonces han tenido un desarrollo exponencial, no sólo por el desarrollo de más técnicas de tratamiento y diagnóstico, también a causa de que los medios de cultivo y los equipos evolucionaron para adaptarse a estos procedimientos y tienen un papel fundamental en el éxito de las técnicas de ART.^{20,36,42}

Los primeros procedimientos se realizaron con la técnica de GIFT (*gamete intrafallopian transfer*) donde se obtenían

los ovocitos por laparoscopia, la muestra seminal se preparaba en el laboratorio y después se transferían los gametos en la trompa por el mismo procedimiento. Las técnicas siguieron evolucionando y se implementan los procesos a la fertilización *in vitro* (FIV), donde los ovocitos se obtienen por punción ovárica con ayuda del ultrasonido, y una vez obtenidos los gametos, todos los procesos se llevan a cabo en el laboratorio. En este punto, también hay un cambio importante, ya que la transferencia se empieza a realizar transvaginal. En cuanto al desarrollo embrionario, primero se realizaban transferencias en el día dos del desarrollo,

* Directora de Laboratorio clínico, andrología y embriología del Centro Mexicano de Fertilidad (CEPAM).

† Bióloga del Laboratorio del Centro Mexicano de Fertilidad (CEPAM). Coordinadora del Laboratorio de Andrología del Centro Mexicano de Fertilidad (CEPAM).

§ Bióloga del Laboratorio del Centro Mexicano de Fertilidad (CEPAM). Hospital Ángeles Lomas.

Tabla 1: Técnicas que se realizan en los diferentes laboratorios dentro de la UART.

Laboratorio de andrología	Laboratorio de FIV	Laboratorio de genética	Laboratorio de criopreservación
<ul style="list-style-type: none"> • Análisis seminal • Pruebas de función espermática • Pruebas de capacitación • Fragmentación de ADN • Capacitación espermática para inseminación intrauterina 	<ul style="list-style-type: none"> • Fertilización in vitro convencional • Micromanipulación • ICSI <ul style="list-style-type: none"> – PICSI – IMSI • Eclosión asistida 	<ul style="list-style-type: none"> • Pruebas de diagnóstico de infertilidad • Pruebas de alteraciones genéticas • Diagnóstico genético preimplantación • Diagnóstico 	<ul style="list-style-type: none"> • De ambriones • De ovocitos • Semen • Tejido testicular • Tejido ovárico (en investigación)

pero gracias al adelanto en medios de cultivo y equipos, en la actualidad casi todas las transferencias se realizan en el quinto día, y aún más, ya en muchos lugares se está realizando lo que llamamos “transferencia diferida”, que en gran medida gracias a la vitrificación se puede esperar a transferir en un ciclo preparado y tener mejores resultados.^{10,20,41,42}

En un principio, con FIV sólo se podía capacitar la muestra espermática y colocarla con los ovocitos en un sistema de cultivo. Esto fue un paso importante porque se logra hacer el seguimiento del desarrollo, desde verificar la fertilización, hasta evaluar y seguir el desarrollo embrionario.

Debido a la gran variedad de técnicas en FIV, el laboratorio se divide en cuatro áreas principales: andrología, FIV, genética y criopreservación (Tabla 1).

Dentro de las técnicas que han marcado un cambio fundamental en ART, está el desarrollo de la técnica de ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) por Palermo y colaboradores (1993), quienes reportaron el primer nacimiento. Esta técnica consiste en la inyección de un solo espermatozoide dentro del ovocito; si bien hoy en día ya es parte de las técnicas de rutina, es importante mencionar que para realizar esta técnica se requiere de un equipo complejo (microscopio invertido, micromanipuladores, inyector, etcétera) (Figura 1). Desde un principio la principal indicación de ésta son las alteraciones en el factor masculino.^{33,36}

Hoy en día se logran mejores resultados al combinar ICSI con las nuevas técnicas, tanto de separación espermática (conocidas en general como técnicas de capacitación espermática), como técnicas de selección que son modificaciones de ICSI (PICSI y el IMSI).^{25,33,39}

Por otra parte, hablando del desarrollo embrionario, hay avances muy importantes también. El principal es la mejora en los medios de cultivo que aportan los nutrientes y protectores necesarios en cada etapa del desarrollo. En un principio, se usaron medios esenciales básicos, pero hoy en día se pasó de medios secuenciales a medios continuos. Estos medios funcionan en conjunto con los sistemas de



Figura 1: Técnica de ICSI.

cultivo y los nuevos equipos de incubación, que ahora están diseñados para las técnicas de FIV. Se pasó de incubadoras de cultivo en general adaptadas poco a poco al cultivo embrionario, a la nueva generación que son incubadoras de mesa (conocidas por todos como *bench-top*) que permiten dar una mezcla de gases que reaccionan con los nuevos medios de cultivo para proveer las condiciones de temperatura, humedad, pero sobre todo, pH y osmolaridad, donde algunas de éstas también dan un registro de estos controles de calidad (Figura 2) con lo que hoy en día

Imagen en color en: www.medigraphic.com/actamedica

podemos tener un desarrollo hasta el día cinco con una mejor calidad.^{20,29,42}

Con lo anterior, debemos tomar en cuenta que gracias a que se lograron mejores condiciones de cultivo, esto permitió que se pudieran dar avances en el diagnóstico genético al disminuir los errores de mosaicismo al poder tomar más células para el diagnóstico cuando se realizan las biopsias embrionarias en un estadio más avanzado.

Técnicas de inseminación

La inseminación convencional es una técnica que se sigue utilizando, pero con la implementación de ICSI se tienen nuevas opciones de tratamiento en pacientes que no podrían lograr la fertilización con técnicas convencionales, dando un giro importante en el tratamiento principalmente del factor masculino.^{33,36}

ICSI

Esta técnica se implementó en el año 1992, y su principal indicación desde un principio fue por alteraciones en el factor masculino, principalmente en sujetos con oligozoospermia severa, pero ha resultado de gran beneficio en cualquier otra alteración del factor masculino, al incluir los casos de azoospermia, donde se puede realizar una biopsia testicular para la obtención de espermatozoides (Figura 3).^{33,34,36}

El ICSI se puede combinar con otras técnicas de selección como HOS (prueba hiposmótica modificada), el uso de láser y pentoxifilina para casos con astenozoospermia severa.^{1,33,40}

Además del factor masculino, también ha probado ser una buena opción en casos de infertilidad inexplicable. Hay estudios que demuestran que hasta en un 30% de casos con muestras normales se puede observar un aumento en

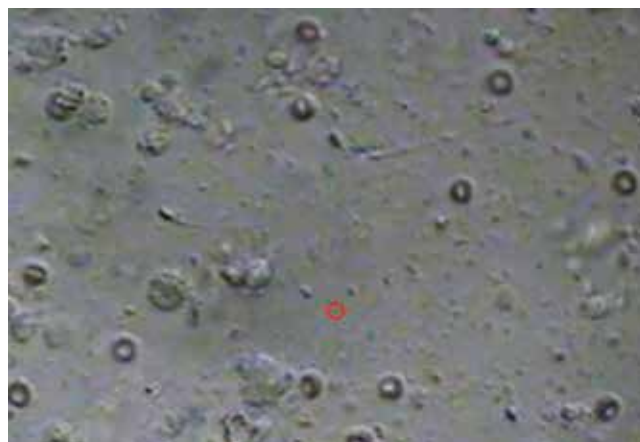


Imagen en color en: www.medigraphic.com/actamedica

Figura 3: Espermatozoides de biopsia testicular.

la fragmentación del ADN (DFI), lo que ya se sabe, tienen relación con alteraciones en el desarrollo embrionario, reducción en las tasas de implantación y aumento de abortos.^{2,6,25,33,45}

La técnica como tal es muy útil, pero con los avances en la investigación han surgido algunas modificaciones al usarla como base para una mejor selección espermática en el momento de la inyección, como son el PICSI y el IMSI, y sus combinaciones con técnicas de separación espermática.

PICSI

En forma natural, el ácido hialurónico (HA) se encuentra en las células del *cumulus* y reacciona con los receptores que se forman durante la maduración espermática, lo que es un indicador de integridad de la cromatina, esta interacción es la que se reproduce en forma artificial para realizar esta técnica, que se ha llamado comúnmente "ICSI fisiológico" debido a que se utilizan dispositivos que contienen HA que reacciona con los receptores del espermatozoide maduro, lo que hace que se puedan seleccionar espermatozoides de mejor calidad con menor grado de fragmentación. En diversas publicaciones se ha mostrado que, con este tipo de selección, aunque no aumenta significativamente la tasa de fertilización, sí hay una disminución en la tasa de abortos.

Es importante mencionar que esta técnica no es costosa, ya que sólo requiere del medio o placas que ya vienen preparadas para usarse, (Figura 4) pero sólo se puede realizar con espermatozoides móviles.^{33,45}

Se ha cuestionado que esta técnica sea de utilidad, pero debido a que los estudios publicados no han comparado el mismo tipo de parámetros de las muestras y casos, no se tiene una conclusión definitiva; se menciona en general que faltan más estudios para demostrar que no da mejores resultados, aunque muchos estudios enfocados de manera



Imagen en color en: www.medigraphic.com/actamedica

Figura 2: Incubadora tipo mesa (*bench top*) con control de pH continuo.

Imagen en color en: www.medigraphic.com/actamedica

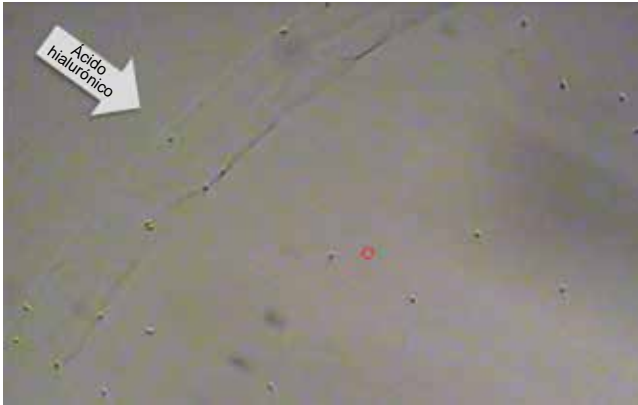


Figura 4: Técnica de PICSI.

específica a alteraciones espermáticas, sí han mostrado menor tasa de aborto.^{11,14,18}

IMSI

La técnica de IMSI requiere de un equipo costoso que se adapta al equipo de micromanipulación del sistema de ICSI y permite por medio del sistema Nomarski un aumento de 6,000 magnificaciones, con lo que se pueden observar anomalías específicas de los espermatozoides que no se pueden observar con el sistema tradicional. El sistema de selección que se emplea es el MSOME (Figura 5), donde se clasifican alteraciones de la pieza intermedia, malformación del flagelo y principalmente la presencia de vacuolas, las cuales tienen una importante correlación con aumento de la fragmentación, aneuploidías, falla en e implantación y aumento de abortos.^{13,21,28}

Esta técnica requiere de entrenamiento y experiencia para poder diferenciar las características morfológicas específicamente con la presencia de vacuolas, ya que debido a su tamaño y posición pueden o no ser consideradas como alteraciones, a causa de que se ha reportado que su presencia puede ser parte normal de la reacción acrosomal.^{33,40}

Después de más de una década de su uso, se concluye que en definitiva es mejor que la técnica tradicional de ICSI, y que sí es útil en casos de teratozoospermia y fallas previas en el embarazo, pero este sistema no es una práctica rutinaria en muchos laboratorios, ya que además de ser costosa, hay un debate en cuanto a que se puede sustituir con otras combinaciones de técnicas que pueden resultar igual de efectivas.^{12,13,40}

Desarrollo embrionario

En la actualidad, con los nuevos avances es una meta importante en este campo realizar transferencias de un solo

embrión que sea sano y además evitar las gestaciones múltiples, para lo cual la aplicación de la tecnología en cuanto a evaluación y selección embrionaria se está aplicando en forma combinada.

La selección embrionaria se realiza por monitoreo diario donde se observa el desarrollo en tiempos ya establecidos, y es una fotografía en el tiempo, en un solo momento del desarrollo. Además, esto implica tener que sacar a los embriones del cultivo y alterar, aunque sea por un momento, sus condiciones óptimas de cultivo. Dentro de las técnicas de evaluación está el sistema de *time-lapse*, que se combina con diagnóstico genético, en un principio para ver su correlación con el desarrollo y alteraciones genéticas, y hoy en día también para complementar el diagnóstico embrionario. Al mismo tiempo las técnicas “ómicas” han avanzado en forma importante y, aunque aún hay camino por recorrer, al parecer serán una herramienta importante en el futuro no sólo para el estudio embrionario, sino también para diagnosticar la receptividad endometrial y su sincronización con el embrión, por lo que en la actualidad ya se empieza a nombrar como “reproductómica”.^{5,27}

Tecnología de *time-lapse*

Desde 1997, Payne y su equipo se realizaron las primeras aportaciones a este tipo de investigación, donde por medio de cámaras de video, y ahora con cámaras fotográficas de alta resolución, se toman fotografías cada cinco a 20 minutos (tomando en cuenta la programación de cada equipo) y se realiza una secuencia donde podemos identificar las características dinámicas del desarrollo embrionario.

En un principio, sólo se podían realizar observaciones hasta las 20 horas, lo cual dio detalles importantes del tiempo en el que se lleva a cabo la fertilización en forma normal.^{30,35}

Con los avances de los equipos, surgieron diferentes sistemas para el estudio dinámico del desarrollo embri-



Figura 5: MSOME-IMSI.



Figura 6: Sistema de *time-lapse*.

nario. El más difundido es una incubadora de mesa donde se incluyen cámaras que siguen cada embrión. Otro es el sistema de cámaras individuales, donde en una incubadora convencional se coloca el sistema (una cámara por paciente) y se realiza el seguimiento (Figura 6). Dentro de estos sistemas hay variaciones donde algunos realizan observación de campo oscuro, etcétera.

Una ventaja importante de este sistema de monitoreo diario es que, al no tener que mover a los embriones de su sistema de incubación, no se alteran sus condiciones de cultivo. De hecho, en un principio se decía que ésta era la razón de que los embriones tuvieran mejor calidad y mejores tasas de embarazo, pero la realidad es que esta tecnología no sólo sirve como un buen sistema de incubación, también proporciona datos que ante no teníamos la posibilidad de observar.^{27,36,17}

Los principales dismorfismos cinéticos que se obtienen con el *time-lapse* son la reversión del desarrollo, división asimétrica, división directa, división caótica, reabsorción de fragmentos, etcétera.^{17,27,37}

En general, se toma en cuenta un algoritmo con todos los datos (cinéticos y morfológicos) para realizar la selección, y para la parte de dismorfismos cinéticos se ha comprobado que si se presentan más de dos dismorfismos están correlacionados con alteraciones genéticas y falla en la implantación.^{17,37}

Como en algunas técnicas actuales, se han desarrollado diferentes algoritmos por centro, por tipo de equipo en cuanto a los tiempos de división y el tipo de dismorfismos, por lo que no es posible hacer una comparación precisa, pero existen diferentes metaanálisis que sí muestran una ventaja en la selección embrionaria.^{8,37,44}

Eclosión asistida

La eclosión o *assisted hatching* (AH) fue desarrollada con el objetivo de adelgazar la zona pelúcida (ZP) en embriones que se van a transferir, para facilitar la eclosión por un posible endurecimiento o alteraciones en la ZP.^{4,22}

Se usaron diferentes métodos para realizarla, de los cuales los principales eran el mecánico y el químico; el más común era el químico, donde se usaba ácido tyrode para disolver la zona, pero ahora se realiza sólo con láser (Figura 7).

Además de los métodos, las técnicas difieren mucho tanto en sus indicaciones como en la técnica en sí. Las técnicas van desde un adelgazamiento de una porción de la ZP, a realizar un agujero, y algunos autores reportaron su eliminación total. Por lo mismo, hay controversia en cuanto a su efectividad, ya que no hay suficientes investigaciones que sean comparables. Las indicaciones también son variadas, aplicándose a aquéllos con falla previa en la implantación con embriones de buena calidad, edad materna, embriones desvitrificados, etcétera. Si en algo coinciden es en que la consideran una buena opción para embriones desvitrificados, a causa de que se obtienen mejores tasas de implantación.^{16,22,43}

USOS DEL LÁSER EN ART

El uso del láser no sólo resultó ser útil para AH, también facilitó y mejoró la manipulación de los embriones para las biopsias de blastómeros cuando se realiza diagnóstico genético en el tercer día, pero aún más en el quinto día al facilitar la técnica, lo cual causa un daño mínimo a los embriones.^{16,36}



Figura 7: *Assisted hatching*.

Otro uso interesante del láser es colapsar el blastocele antes de la vitrificación de blastocistos, esta técnica, aunque con resultados aceptables, no ha mostrado tener una mejora significativa.¹⁶

Como ya se mencionó antes, también se usa en la selección espermática en casos de astenozoospermia. Se da un disparo en el flagelo del espermatozoide inmóvil y si éste reacciona es la indicación para saber que se puede usar para ICSI; aunque hay pocos estudios al respecto, han mostrado tener mejores tasas de fertilización con este tipo de selección.^{1,40}

CRIOPRESERVACIÓN

Esta técnica se inicia como parte de las técnicas de ART, y era necesaria para poder preservar los embriones “sobrantes” que no se transferían. Se usó la técnica lenta de criopreservación, que requiere de mucho tiempo y equipo especial para realizarse, con el inconveniente de que no resulta efectiva para criopreservar ovocitos. Las técnicas evolucionaron y se desarrolló la técnica de la vitrificación, la cual se considera rutinaria ya que marca un suceso importante en los tratamientos al mejorar los resultados, y lo más significativo, se logra con éxito la criopreservación de ovocitos que cambia en gran medida las opciones de tratamiento en muchos casos, como la preservación de la fertilidad por tratamiento gonadotóxico, la preservación para posponer la fertilidad, y muy importante, permitió tener más seguridad para realizar transferencias embrionarias diferidas sobre todo por aumento en la progesterona, también en los casos de riesgo SHO, cuando el endometrio no es receptivo, y en varias ocasiones por otros eventos donde se requiera de posponer la transferencia.^{38,32,26}

En cuanto a los tratamientos gonadotóxicos, en especial para el cáncer, aunque han mejorado la sobrevivencia en muchos casos pueden causar infertilidad, por lo que el término de oncofertilidad es cada vez más común al conjuntar las técnicas de FIV para preservar la fertilidad de los sujetos.³⁸

En el caso de la preservación para el varón, se ha usado por mucho tiempo la criopreservación del semen y el tejido testicular, pero en caso de niños prepúberes esta técnica aún se considera experimental, aunque ha habido avances importantes. Existen reportes donde las muestras conservan su viabilidad después de la descongelación después de 20 años de estar almacenadas.^{23,32}

Ha sido posible realizar la vitrificación en ovocitos y hoy en día es una técnica común para la preservación en mujeres, que resulta mejor desde el punto de vista ético, ya que la preservación de embriones es compleja en caso de mujeres solteras y de niñas. Al igual que para niñas prepúberes, la preservación del tejido ovárico aún se considera experimental,

aunque ya hay a nivel mundial muchos casos de éxito con esta técnica, ya que a pesar de intentos con otras opciones, como la trasposición del ovario y tratamientos hormonales, éstas no han resultado prácticas.^{7,9,19,24}

Pruebas de receptividad endometrial

La receptividad endometrial se intuye con mediciones de imagenología y hormonales, pero en la actualidad existen pruebas que combinan la reproductómica y la inmunología para poder tener un pronóstico de la receptividad y sincronización del endometrio con el desarrollo embrionario. Aunque en forma comercial existen varias pruebas, aún sigue la investigación para poder determinar en forma precisa si la combinación de todas estas moléculas es el mejor indicador, pero diferentes estudios muestran una tendencia a mejorar los resultados.^{5,15,41}

FUTURO

Hay un gran número de publicaciones que presentan nuevas técnicas, como el uso de la robótica para criopreservación y micromanipulación, investigación sobre reproductómica, enfermedades mitocondriales, genética, etcétera.

CONCLUSIONES

Cada vez hay más avances en la tecnología utilizada en las técnicas FIV, las cuales ayudan a poder realizar mejores diagnósticos y tratamientos individualizados en los casos de infertilidad. Además, los descubrimientos han demostrado que pueden ser parte por completo de otras disciplinas.

REFERENCIAS

1. Aamir J, Ashwini LS, Ganguly D, Murugan S, Muthiah SS, Shabin Kainoth, Gopinath Rami Reddy. Interpretation: real time assessment on immotile but viable spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection (Icsi): an embryologists outlook. *Austin J In vitro Fertil.* 2015; 2 (3): 1021.
2. Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol.* 2016; 5 (6): 935-950.
3. Al-Nusim L, Jenkins J. A brief historical review of assisted reproduction. *SAJOG.* 2007; 13 (2): 38-41.
4. Alteri A, Viganò P, Maizar AA, Jovine L, Giacomini E, Rubino P. Revisiting embryo assisted hatching approaches: a systematic review of the current protocols. *J Assis Reprod Gen.* 2018; 35 (3): 367-391.
5. Altma S, Esteban FJ, Stavreus-Evers A, Simon C, Giudice L, Lessey BA et al. Guidelines for the design, analysis and interpretation of ‘omics’ data: focus on human endometrium. *Hum Reprod Update.* 2014; 20 (1): 12-28.
6. Ambe AK, Mondragón EC, González SE. Impact of spermatozoid head anomalies as predictor factor of non-determined infertility. *Ginecol Obstet Mex.* 2008; 76 (3): 151-155.

7. Amorim CA, Shikanov A. The artificial ovary: current status and future perspectives. *Future Oncol.* 2016; 12 (20): 2323-2332.
8. Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction (Review). *Cochrane Database of Syst Rev.* 2018; (5): CD011320.
9. Asada Y, Tokoro M, Sonohara M, Fukunaga N, Hattori Y, Hashiba Y. Long-term outcomes of freeze-all strategy: a retrospective analysis from a single ART center in Japan. *Reprod Med Biol.* 2019; 18 (2): 173-179.
10. Asch RH, Balmaceda JP, Ellsworth LR, Wong PC. Preliminary experiences with gamete intrafallopian transfer (GIFT). *Fertil Steril.* 1986; 45 (6): 366-371.
11. Avalos-Durán G, Cañedo-Del Ángel AME, Rivero-Murillo J, Zambrano-Guerrero JE, Carballo-Mondragón E, Checa-Vizcaíno MA. Physiological ICSI (PICSI) vs. conventional ICSI in couples with male factor: A systematic review. *JBRA Assist Reprod.* 2018; 22 (2): 139-147.
12. Jeve YB, Potdar N, Blower JA, Gelbaya T. Strategies to improve fertilisation rates with assisted conception: a systematic review. *Hum Fertil (Camb).* 2018; 21 (4): 229-247.
13. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med.* 2001; 345 (14): 1067-1068.
14. Castillo-Baso J, Garcia-Villafaña G, Santos-Haliscak R, Diaz P, Sepulveda-Gonzalez J, Hernandez-Ayup S. Embryo quality and reproductive outcomes of spermatozoa selected by physiologic-icsi or conventional icsi in patients with kruger < 4% and > 4% normomorphology. *Fertil Steril.* 2011; 96: S159.
15. Craciunas L, Gallos I, Chu J, Bourne T, Quenby S, Brosens JJ, Coomarasamy A. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2019; 25 (2): 202-223.
16. Davidson LM, Liu Y, Griffiths T, Jones C, Coward K. Laser technology in the assisted reproductive technology laboratory: a narrative review. *Reprod Biomed Online.* 2019; 38 (5): 725-739.
17. Desai N, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. Are cleavage anomalies, multinucleation, or specific cell cycle kinetics observed with time-lapse imaging predictive of embryo developmental capacity or ploidy? *Fertil Steril.* 2018; 109 (4): 665-674.
18. Erberelli RF, Salgado RM, Mendes Pereira DH, Wolff P. Hyaluronan-binding system for sperm selection enhances pregnancy rates in ICSI cycles associated with male factor infertility. *JBRA Assist Reprod.* 2017; 21 (1): 2-6.
19. Fisch B, Abir R. Female fertility preservation: past, present and future. *Reproduction.* 2018; 156 (1): F11-F27.
20. Gardner DK, Kelley RL. Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype. *J Dev Orig Health Dis.* 2017; 8 (4): 418-435.
21. Gatimel N, Parinaud J, Leandri RD. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) does not improve outcome in patients with two successive IVF-ICSI failures. *J Assist Reprod Genet.* 2016; 33: 349-355.
22. Jeong J, Joo BS, Kim CW, Kim HC, Joo JK, Lee KS. Effects of three-area laser-assisted zona thinning in 8-cell human embryos on pregnancy outcomes *in vitro* fertilization. *Clin Exp Reprod Med.* 2018; 45 (1): 25-30.
23. Kably-Ambe A, Carballo-Mondragon E, Roque-Sanchez AM, Duran Monterosas L, Amaro-Hernandez EA. Evaluation of semen parameters in long term cryopreserved samples for over 10 years. *Ginecol Obstet Mex.* 2016; 84 (01): 1-6.
24. Kim S, Lee Y, Lee S, Kim T. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in patients with cancer. *Obstet Gynecol Sci.* 2018; 61 (4): 431-442.
25. Khadem N, Poorhoseyni A, Jalali M, Akbary A, Heydari ST. Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia.* 2014; 46 (2): 126-130.
26. Knudtson JF, Faylor CM, Gelfond JA, Goros MW, Chang TA, Schenken RS, Robinson RD. Assisted hatching and live births in first cycle, Frozen embryo transfers. *Fertil Steril.* 2017; 108 (4): 628-634.
27. Kovacs P. Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod and Biol and Endocrinol.* 2014; 12: 124.
28. Luna D, Hilario R, Dueñas-Chacón J, Romero R, Zavala P, Villegas L, García-Ferreira J. The IMSI procedure improves laboratory and clinical outcomes without compromising the aneuploidy rate when compared to the classical ICSI procedure. *Clin Med Insights Reprod Health.* 2015; 9: 29-37.
29. Mantikou E, Youssef MFM, van Wely M, van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, Mastenbroek S. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2013; 19 (3): 210-220.
30. Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during *in vitro* development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199: 660.e1-660.e5.
31. Miravet-Valenciano JA, Rincon-Bertolina A, Vilellab F, Simon C. Understanding and improving endometrial receptivity. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2015; 27 (3): 187-192.
32. Onofre J, Baert Y, Faes K, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Hum Reprod Update.* 2016; 22 (6): 744-761.
33. Osman E, Franasiak J, Scott R. Oocyte and embryo manipulation and epigenetics. *Semin Reprod Med.* 2018; 36 (3-04): e1-e9.
34. Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1993; 59 (4): 826-835.
35. Payne d, Flaherty sp, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod.* 1997; 12 (3): 532-541.
36. Picton HM, Wyns C, Anderson RA, Goossens E, Jahnukainen K, Kliesch S et al. On behalf of the ESHRE task force on fertility preservation in severe diseases. A european perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Hum Reprod.* 2015; 30 (11): 2463-2475.
37. Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2017; 35 (59): 511-520.
38. Ribeiro CJ, Japur AC, de S'a Rosa-e-Silva. Cryopreservation and Fertility: Current and Prospective Possibilities for Female Cancer Patients. *ISRN Obstet Gynecol.* 2011; 2011: 350813.
39. Rosenwaks Z, Pereira N. The pioneering of intracytoplasmic sperm injection: historical perspectives. *Reproduction.* 2017; 154 (6): F71-F77.
40. Simopoulou M, Gkoles L, Bakas P, Giannelou P, Kalampokas T, Pantos K, Koutsilieris M. Improving ICSI: a review from the spermatozoon perspective. *Syst Biol Reprod Med.* 2016; 62 (6): 359-371.
41. Suhorutshenko M, Kukushkina V, Velthut-Meikas A, Altmäe S, Peters M, Mägi R et al. Endometrial receptivity revisited: endometrial transcriptome adjusted for tissue cellular heterogeneity. *Hum Reprod.* 2018; 33 (11): 2074-2086.
42. Swain JE. Decisions for the IVF laboratory: comparative analysis of embryo culture incubators. *Reprod Biomed Online.* 2014; 28 (5): 535-547.
43. Tannus S, Cohen Y, Henderson S, Son WY, Tulandi T. The effect of assisted hatching on live birth rate following fresh embryo transfer in advanced maternal age. *Reprod Sci.* 2019; 26 (6): 806-811.
44. Wirka AK, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B et al. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril.* 2014; 14 (101): 1637-1648.
45. Witt KD, Beresford L, Bhattacharya S, Brian K, Coomarasamy A, Hooper R et al. Hyaluronic acid binding sperm selection for assisted reproduction treatment (HABSelect): study protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMJ Open.* 2016; 6 (10): e012609.