



Estudio multicéntrico de las tendencias de las técnicas de fertilización *in vitro* a 30 años de su introducción en México

Multicenter study of the trends of *in vitro* fertilization techniques 30 years after its introduction in Mexico.

Sandra Patricia Cubillos-García,¹ Genaro García-Villafaña,² Antonio Vidal Pascual-Rodríguez,³ Claudia González-Ortega,⁴ Alma Cepeda-Reyes,⁵ Esperanza Carballo-Mondragón,⁶ Paloma Neri-Vidaurre,⁷ Luis Agustín Gallardo-Trejo,⁸ Octavio Díaz-Gutiérrez,⁹ Rodolfo Canseco-Sedano¹⁰

Resumen

OBJETIVO: Analizar la tendencia en México en la aplicación de la la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y la fertilización *in vitro* con ovocitos propios o donados en los 30 primeros años de reproducción asistida. Además, revisar algunos aspectos que han suscitado controversia en la aplicación, indicación y seguridad de estas técnicas.

MATERIALES Y MÉTODO: Estudio multicéntrico, retrospectivo y descriptivo llevado a cabo en 10 clínicas de diversas zonas del país entre 1987 y 2017.

RESULTADOS: Entre 2005 y 2010 hubo un incremento en la práctica de la ICSI con ovocitos propios de 36.4% y con ovocitos donados de 31.8%; para el periodo 2011-2017 con ovocitos propios fue de 45.1 y de 44.1% con ovocitos donados.

CONCLUSIONES: En 30 años de reproducción asistida en México se advierte que la ICSI va en aumento y es independiente de la cantidad de ciclos efectuados por clínica o por región del país. Las causas de este aumento podrían deberse a la mayor cantidad de casos de infertilidad masculina que llegan a las clínicas o a una aplicación excesiva de la técnica por políticas internas de cada centro. La evaluación de estos datos en la República Mexicana permite generar directrices para la toma de decisiones en estandarización de protocolos de trabajo en reproducción asistida.

PALABRAS CLAVE: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI); fertilización *in vitro*; infertilidad, mujer; reproducción; virus de inmunodeficiencia; estudio retrospectivo; México.

Abstract

OBJECTIVE: To know the trend of the use of *in vitro* fertilization techniques, ICSI (intracytoplasmic sperm injection) FIV (fertilization *in vitro*) or FIV/ICSI in donated and own eggs in the first 30 years of assisted reproduction in Mexico.

MATERIALS AND METHOD: A multicentric, retrospective and descriptive study in 10 clinics of different zones of the country since 1987 to 2017.

RESULTS: There was an increase of the use of the ICSI between periods, from 2005 to 2010 in own eggs was 36.4% and in donated eggs 31.8%, for the period from 2011 to 2017 in own eggs was 45.1% and 44.1% in donated eggs.

CONCLUSIONS: In 30 years of assisted reproduction in Mexico, the use of the ICSI goes in increase and is independent from the number of cycles made by the clinics or by the region of the country, the reasons of this increase might owe to the major number of infertility male factor cases that come to the clinics or to an excessive use of the technique by internal policies of every center. The evaluation of this data in all country would help in the decisions-making process to standardize protocols of work in assisted reproduction in Mexico.

KEYWORDS: Sperm injection; ICSI; Fertilization *in vitro*; Infertility, Male; Reproduction; Immunodeficiency Virus; Retrospective Studies, Mexico.

¹ Química clínica, directora del Laboratorio Concibe Reproducción Asistida, Ciudad de México.

² Biólogo, director del Laboratorio, Instituto IECH, Monterrey, Nuevo León.

³ Licenciado en Ciencias Biológicas, director del Laboratorio, Instituto VIDA Guadalajara, Jalisco.

⁴ Química clínica, directora del Laboratorio, Instituto VIDA León, Guanajuato.

⁵ Química clínica, directora del Laboratorio, Instituto VIDA Matamoros, Tamaulipas.

⁶ Médica veterinaria, directora del Laboratorio, Centro Mexicano de Fertilidad, Huixquilucan, Estado de México.

⁷ Maestra en Ciencias, directora del Laboratorio CEERH, Ciudad de México.

⁸ Laboratorista de Análisis clínicos, director del Laboratorio FILIUS, San Luis Potosí, SLP.

⁹ Maestro en Ciencias, director del Laboratorio URA-CIMA, Hermosillo, Sonora.

¹⁰ Doctor en Ciencias, director del Laboratorio, Centro de Diagnóstico Ginecológico, Veracruz, Ver.

Recibido: noviembre 2018

Aceptado: mayo 2019

Correspondencia

Sandra Patricia Cubillos García
scubillos@concibe.com.mx

Este artículo debe citarse como

Cubillos-García SP, García-Villafaña G, Pascual-Rodríguez A y col. Estudio multicéntrico de las tendencias de las técnicas de fertilización *in vitro* a 30 años de su introducción en México. Reproducción (México) 2019; Vol. 10: 17 de junio 1-9
<https://doi.org/10.24245/rmmr.v10id.3242>

ANTECEDENTES

Robert Edwards, junto con Patrick Steptoe, hicieron posible el primer nacimiento *in vitro* del mundo el 25 de julio de 1978.¹ El logro de esta primera fertilización *in vitro* le otorgó a Edwards el premio Nobel de Fisiología 2010.² A partir de la década de 1980, hasta ahora, esta técnica de fertilización *in vitro* sigue aplicándose diariamente en muchos laboratorios de reproducción asistida de todo el mundo.

En 1992 se propuso la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) como tratamiento del factor masculino que dio lugar a un gran cambio en la práctica clínica de las técnicas de reproducción asistida.³ Esta técnica ofrece otras perspectivas en el tratamiento de la esterilidad de origen masculino pues con ella se logra la fertilización y gestación, incluso en casos extremos en los que se recupera un escaso número de espermatozoides poco móviles.

En cuanto a los aspectos técnicos, la ICSI se ha convertido en un tratamiento de rutina con el que se han conseguido más de 2.5 millones de nacidos vivos en el mundo.⁴ Esta técnica consiste en la introducción de un único espermatozoide vivo, inmóvil, al interior del citoplasma de un ovocito maduro (en metafase II), con la ayuda de un micromanipulador.³ Con esta técnica se logra ir más allá de la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito, la penetración de ésta y de la membrana plasmática, de manera tal que no se requiere la capacitación espermática ni la reacción acrosómica.⁵ El éxito en la aplicación de la técnica ICSI depende de la experiencia del personal, el tiempo en que se efectúa el procedimiento, los materiales utilizados, condiciones ambientales, calidad del espermatozoide y las características del ovocito.^{6,7}

Entre las consideraciones a tener en cuenta durante la ejecución de la técnica están: *inmovilización*

del espermatozoide: se realiza mediante un golpe suave en el flagelo espermático con la pipeta de microinyección. Este paso daña ligeramente la membrana plasmática, lo que permite la reacción acrosómica, genera cambios en el espermatozoide que inducen la activación ovocitaria, la descondensación, la formación del pronúcleo masculino, y previene el daño en las estructuras celulares del ovocito por el movimiento activo del flagelo del espermatozoide al momento de la inyección. *Aspiración del citoplasma del ovocito*: provoca la ruptura controlada de la membrana citoplasmática y el oolema al penetrar a través de la zona pelúcida; esto puede influir en el resultado del procedimiento de inyección porque no todos los ovocitos reaccionan igual a la microinyección y presentan una resistencia variable cuando se pretende atravesar la membrana citoplasmática. Un porcentaje variable de casi 5% de los ovocitos microinyectados se degenera durante el procedimiento, dependiendo de la calidad de los ovocitos y de la experiencia en ejecutar la técnica.⁸

Posición del corpúsculo polar: para evitar dañar la placa metafásica, el corpúsculo polar se sitúa en posición de las manecillas del reloj a la 6 o 12 horas y la inyección se efectúa en el punto de las 3. En la bibliografía se demuestra que aunque no haya diferencias en el porcentaje de supervivencia y fertilización relacionadas con la posición del corpúsculo polar, sí hay variaciones en la calidad embrionaria en cuanto al grado de fragmentación, que varía según la técnica de ICSI.^{5,7,9} En los últimos años se desarrollaron varias técnicas para que la selección del espermatozoide a inyectar sea más exhaustiva, como la inyección intracitoplasmática del espermatozoide morfológicamente seleccionado (IMSI)^{10,11} o la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide seleccionado químicamente (PICSI), que es a través de la afinidad a una matriz de ácido hialurónico.¹² Estas dos técnicas requieren la ICSI, posterior a la selección espermática.



A partir de que comenzó a aplicarse la fertilización *in vitro*, la mayoría de los pacientes con muestras seminales normales o astenozoospermicas ha podido conseguir la fertilización y los embriones para transferir.¹³ En casos de factor masculino severo, la ICSI es la elección adecuada.³ Así, a partir de 1992 esta técnica se aplica rutinariamente en México, en Latinoamérica y en el mundo.¹⁴ En las dos últimas décadas su aplicación se ha incrementado considerablemente en pacientes sin factor masculino.¹⁴ Hoy, las tasas de embarazo por aspiración folicular o transferencia embrionaria son equiparables entre ICSI y FIV, como se demuestra en los registros nacionales de reproducción asistida de Europa,¹⁵ Estados Unidos,¹⁶ Australia, Nueva Zelanda¹⁷ y América Latina.¹⁸

Además de los aspectos éticos, el tema de mayor controversia a partir de la incorporación de la técnica de ICSI ha sido la seguridad de la manipulación de gametos.¹⁹ Por esto los efectos genéticos han sido motivo de múltiples investigaciones para documentar la salud de los niños nacidos por reproducción asistida y la posible asociación con alteraciones de impronta genética. Hasta ahora, esta información sigue sin ser suficientemente clara y los resultados han sido contradictorios.²⁰ Algunas estadísticas de niños nacidos por técnicas de reproducción asistida muestran una aparente evidencia de malformaciones neonatales, peso bajo al nacer y errores de impronta genética.²¹ Esos estudios no se han relacionado, del todo, con procedimientos de ICSI o FIV directamente porque hay sesgos en los estudios cuando se evalúan los diagnósticos de infertilidad de sus padres.²² En varias investigaciones se ha indagado el posible vínculo de los síndrome de Beckwith-Wiedemann, de Prader-Willi y de Angelman con la impronta genética y la reproducción asistida.²⁰

El objetivo de este trabajo fue: analizar la tendencia en México en la aplicación de la ICSI y

la fertilización *in vitro* con ovocitos propios o donados en los 30 primeros años de reproducción asistida. Además, revisar algunos aspectos que han suscitado controversia en la aplicación, indicación y seguridad de estas técnicas.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio multicéntrico, retrospectivo y descriptivo llevado a cabo en 10 clínicas de diversas zonas del país entre 1987 y 2017. Variables de estudio: ICSI y FIV-ICSI con ovocitos propios o donados. Los datos se analizaron en cinco periodos según los datos recuperados de las clínicas participantes: 1987-1992, 1993-1998, 1999-2004, 2005-2010, 2011-2017. Los datos se analizaron con el paquete estadístico para ciencias sociales (SPSS) versión 21, utilizando los procesos de análisis de respuestas múltiples y descriptivos.

RESULTADOS

Se analizaron 29,644 ciclos de ovocitos propios y 8921 de ovocitos donados para describir la tendencia de la aplicación de la ICSI vs FIV. El **Cuadro 1** muestra la cantidad de ciclos de reproducción asistida efectuados en 10 clínicas de la República Mexicana en 30 años, tiempo en que se registraron 38,565 ciclos.

Las **Figuras 1 y 2** muestran la distribución de la aplicación de las técnicas de FIV e ICSI entre los años 1987 a 2017 en México en las diez clínicas participantes. En la **Figura 1** se observa reducción en la práctica de la fertilización *in vitro* e incremento en la ICSI entre 1999-2004 y 2005-2010.

En el caso de ovocitos donados (**Figura 2**) solo se muestran cuatro periodos porque antes de 1993 no se practicaba la donación de ovocitos en México. En donde sí hubo reducción de la técnica de FIV e incremento de la ICSI fue en 1999-2004 y 2011-2017.

Cuadro 1. Número de ciclos realizados en 10 clínicas de reproducción asistida en México de 1987 a 2017

	FIV	%FIV	ICSI	%ICSI	FIV/ICSI	%FIV/ICSI	Total
Óvulos propios	10,061	33.9	16,599	55.9	2984	10	29,644
Óvulos donados	4085	45.7	3814	42.7	1022	11.4	8921

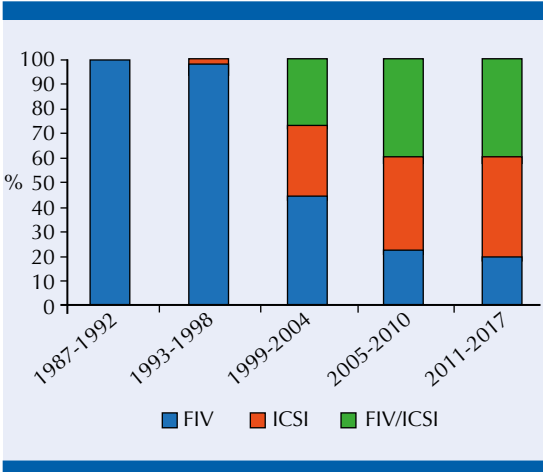


Figura 1. Distribución del uso de FIV, ICSI y FIV/ICSI en óvulos propios en México de 1987 a 2017.

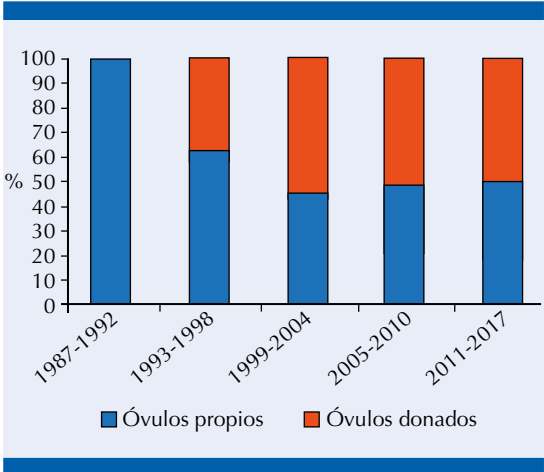


Figura 3. Frecuencia de óvulos propios y donados en México 1987-2017.

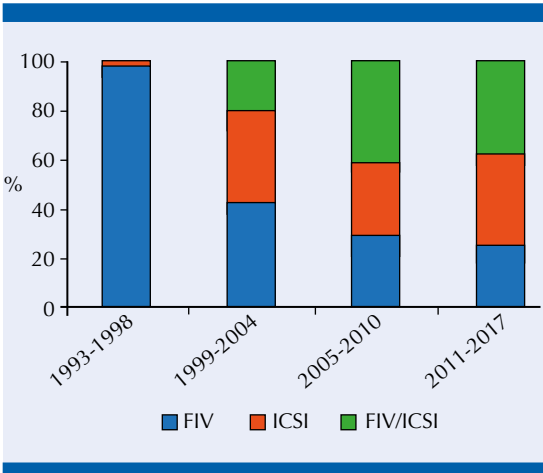


Figura 2. Distribución del uso de FIV, ICSI y FIV/ICSI en óvulos donados en México de 1987 a 2017.

En la **Figura 3** se observa una comparación general de la cantidad de ciclos con ovocitos propios y donados en 30 años de reproducción

asistida en México, en donde hubo incremento de las técnicas con ovocitos donados.

En las **Figuras 4 y 5** se ve cómo la práctica de la fertilización *in vitro* ha ido disminuyendo a lo largo del tiempo y se ha incrementado la de la ICSI, sola o combinada, para tratamientos de reproducción asistida en México.

DISCUSIÓN

En este estudio preliminar se reporta la cantidad de ciclos de ovocitos propios y donados en México, datos muy representativos de la actividad de la reproducción asistida en los primeros 30 años, que muestran, de acuerdo con los reportes de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, que México es el tercer país, después de Brasil y Argentina que más realiza ciclos de reproducción asistida en Latinoamérica.²³

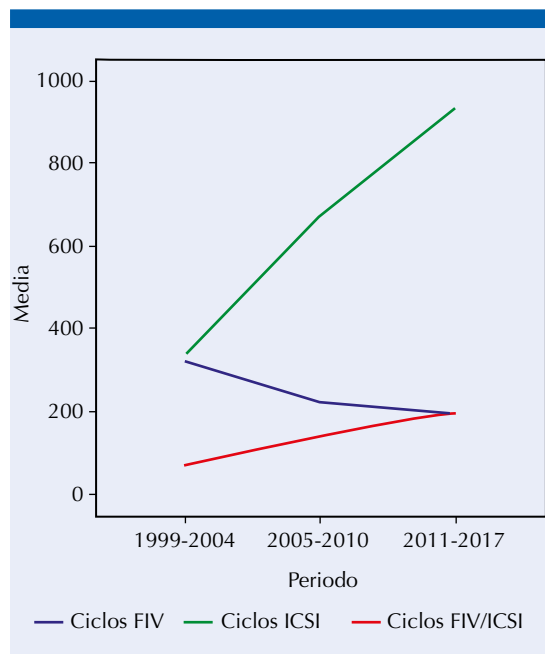


Figura 4. Media del uso de técnica de fecundación *in vitro* en óvulos propios, 1987-2017.

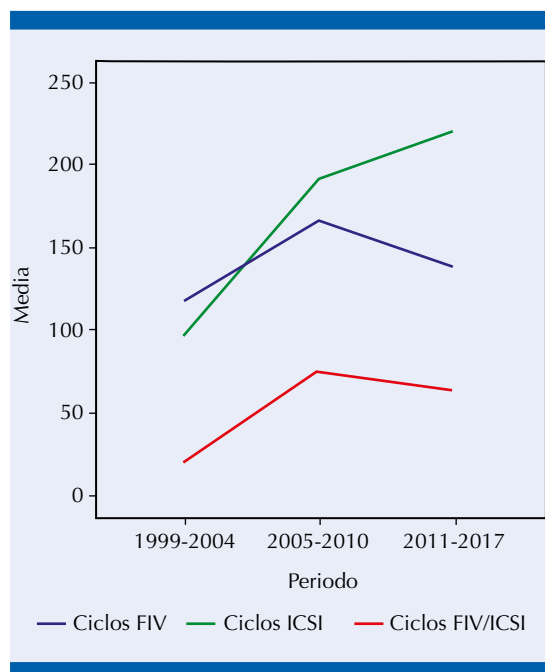


Figura 5. Media del uso de técnica de fecundación *in vitro* en óvulos donados, 1987-2017.

La inyección intracitoplásmica del espermatozoide se desarrolló para resolver los casos de infertilidad de origen masculino que no podían tratarse con fertilización *in vitro* convencional debido a las alteraciones en la calidad de los espermatozoides (espermatozoides extraídos quirúrgicamente o en pacientes con oligoastoteratozoospermia).²⁴⁻²⁶

A partir de la incorporación de la ICSI a la rutina del trabajo del laboratorio de embriología surgieron preguntas respecto de los efectos de la técnica, por el hecho de traspasar artificialmente las barreras naturales de la fertilización que pudieran transmitir o provocar alteraciones genéticas o epigenéticas en la descendencia, así como la transmisión de alteraciones de una generación a otra. Varios autores han reportado efectos adversos derivados de la ICSI,^{21,22} sin establecer debidamente si esos efectos son consecuencia de la técnica por sí sola, de las alteraciones inherentes de la infertilidad o de otros padecimientos de la pareja. En los niños nacidos mediante ICSI se ha asociado un incremento de 1 a 4 veces de anomalías cromosómicas, defectos al nacimiento y alteraciones de impronta genómica, al comparar estos datos con los de los niños nacidos por fertilización *in vitro*.⁹ Ésta es una de las razones por las que se recomienda precaución al momento de extender la ICSI como método de inseminación en reemplazo de la fertilización *in vitro* convencional.

Por lo que se refiere a la aplicación de las técnicas de FIV e ICSI en ovocitos propios o donados entre los años 1987 a 2017 se demuestra que hubo un aumento exponencial de la ICSI sola o combinada. Este incremento puede deberse, en cierta medida, a las nuevas indicaciones del tratamiento de reproducción asistida que solo señalan a la ICSI (por ejemplo, en ciclos de tamizaje genético preimplantatorio [PGA, PGT, PGD, PGS, maduración *in vitro* de ovocitos u ovocitos desvitrificados]).²³ En estos últimos el proceso de

vitrificación en sí y la remoción previa de células provoca modificaciones en la zona pelúcida que afectan la fertilización por FIV convencional,²⁴ además de las estrategias para seleccionar mejor el espermatozoide a nivel morfológico (IMSI²⁶ o químico PICSI),¹² que es una modificación posterior de la técnica de ICSI.

En la actualidad, varios estudios reportan el aumento en la aplicación de la ICSI por su indicación principal: factor masculino. Su aplicación en casos de infertilidad inexplicable y falla previa en la fertilización con la técnica convencional no ha resultado eficaz; aun así, su práctica sigue extendiéndose sin indicaciones específicas.^{27,28}

El mayor temor en reproducción asistida es, lógicamente, la falla en la FIV tradicional porque es un suceso que frustra a las pacientes, médicos y embriólogos. Por esto en algunos centros todos los ovocitos del ciclo de tratamiento solo se implantan mediante ICSI.^{29,30} Esta decisión debiera reevaluarse con base en las recomendaciones internacionales y la medicina personalizada con sustento en la evidencia hoy disponible para no abusar de la técnica.³¹

El aumento de los factores de infertilidad masculina y femenina, donde la esterilidad es de origen desconocido y la edad materna avanzada, puede ser una de las causas del incremento en la solicitud de la ICSI en las clínicas de reproducción.³²

En muchos centros las mujeres que no quedan embarazadas después de varias inseminaciones artificiales, en el siguiente ciclo de tratamiento pasan directamente a la ICSI, cuando deberían tratarse con FIV-ICSI si hubo falla en la inseminación.³³⁻³⁵

La media de ciclos de ICSI con respecto a FIV convencional está aumentando en otras

latitudes al igual que en México donde la FIV ha ido disminuyendo con el paso de los años y en contraparte ha aumentado la ICSI sola o combinada con ovocitos propios o donados. En este estudio inicial no se alcanza a vislumbrar un motivo claro que justifique este aumento, como podría ser el factor masculino severo. Ante una falla en la inseminación por FIV en un ciclo previo puede tratarse de un caso de infertilidad mixta, infertilidad de origen desconocido, factor masculino moderado, poca cantidad de ovocitos recuperados, edad materna avanzada u otros diagnósticos, muchas veces se opta por la ICSI "porque asegura la fecundación".³⁶ En esos casos, quizá la FIV convencional podría ayudar en muchos casos a tener mayor cantidad de embriones fecundados al no descartar ovocitos por inmadurez nuclear o ayudaría a tener mejor calidad embrionaria en embriones procedentes de FIV cuando está afectada la calidad ovocitaria,³⁷ como en el caso de ovocitos procedentes de pacientes con diagnóstico de ovario poliquístico o edad materna avanzada.³⁸

La Sociedad Americana de Reproducción Asistida (ASRM) no recomienda la ICSI de rutina en parejas que no tienen alteraciones severas del factor masculino, por los efectos adversos que la ICSI pudiera originar.³⁹ La dificultad e inexistencia de seguimiento a largo plazo de los niños nacidos mediante reproducción asistida, en México y en otros países, no permiten que haya evidencia clara de los efectos de cada una de estas técnicas.⁴⁰

Por tradición, los datos reportados en todas las agrupaciones encargadas de los reportes muestran datos de FIV e ICSI sin reportar los datos de los ciclos que se efectúan por las dos técnicas en el mismo ciclo, en donde hay sesgo en el reporte porque muchas veces los datos de FIV-ICSI se toman como ciclos de ICSI, cuando quizá el o los embriones transferidos en ese ciclo a la paciente fueron de FIV y no de ICSI.⁴⁰



En el Reporte del Comité Internacional de Reproducción Asistida (ICMART) de 2008, 2009 y 2010 se evaluaron 4.5 millones de ciclos y la variación por regiones en la práctica de la ICSI con respecto a la fertilización *in vitro* convencional reportó un límite de 64% en Asia y 98% en el Medio Este.⁴¹ En el reporte de 2011, un total de 1,115,272 ciclos de los que en FIV-ICSI la mortalidad perinatal por cada 1000 nacimientos fue de 21 en 2010 y de 16.3 en 2011 aclaran que los datos reportados dependen de la veracidad del reporte de cada país y que cubre casi las dos terceras partes de la actividad de reproducción asistida del mundo.⁴²

En Australia, la práctica de la ICSI se incrementó de 57.8% en 2005 a 67.5% en 2014 sin haber un aumento proporcional en el factor masculino severo. Li Z y su grupo (2018) reportaron que la intervención de la ICSI en casos donde no hay factor masculino severo no incrementa la tasa acumulativa de embarazo. En su revisión de 14,693 ciclos reportaron una tasa de embarazo de 37% para FIV y 36% para ICSI.²⁹ Boulet y su grupo (2015) informaron en Estados Unidos un aumento en la práctica de la ICSI de 36.4 a 76.2%, sin un incremento proporcional del factor masculino; esto evidenció el abuso en la aplicación de la técnica.⁴³ En Latinoamérica, la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida agrupa gran parte de los reportes de los centros en Latinoamérica. En 2014 reportó 35,023 ciclos aspirados, de los que 29,935 fueron de ICSI y 5088 de FIV; es decir, 85.47% de ciclos de ICSI vs 14.53% de FIV.²³

En este estudio se encontró un incremento en la práctica de la ICSI entre periodos, en el de 2005-2010 para ovocitos propios fue de 36.47% y para ovocitos donados 31.85%. Para el periodo 2011-2017 en ovocitos propios aumentó a 45.1 y 44.12% en ovocitos donados.

Otro hallazgo interesante es la cantidad de ciclos efectuados con donación de ovocitos de

29.95% en 1999 a 37.8% en 2017, porcentajes parecidos a los de los reportes mundiales de uso de ovocitos donados por el aumento de la edad materna en la consulta de infertilidad.⁴⁴

Se carece de evidencia definitiva de que los niños nacidos mediante ICSI padezcan enfermedades genéticas en proporción mayor a la de la población general.^{21,45} Esto no descarta que sea deseable asesorar debidamente a las parejas en quienes se aplicará esta técnica, sobre todo a las que tienen familias con antecedentes de problemas severos de infertilidad.

La práctica clínica de reproducción asistida no debiera estar condicionada por la cobertura de salud que haya en un centro público, en uno privado o en una ciudad más pequeña. Sin duda la ICSI eleva los costos, el tiempo y exposición de los gametos. No se sugiere limitar las mejores opciones en favor del lucro económico, como se advierte en algunos países en donde al no estar incluida la reproducción asistida en la cobertura de salud pública se registran diferencias muy marcadas entre centros públicos y privados por la reducción de costos en el tratamiento.⁴⁶⁻⁴⁸

Es necesario llevar a cabo estudios moleculares en poblaciones grandes y en diferentes etnias que ayuden a dilucidar cuál es la verdadera trascendencia de la ICSI y de las demás técnicas de reproducción asistida en los niños nacidos por estos procedimientos. Ante la evidencia de que la ICSI no proporciona mayores tasas de embarazo que la FIV convencional en parejas cuya causa de esterilidad no sea el factor masculino,⁴⁵ algunas parejas infértiles podrían beneficiarse de la indicación menos frecuente de la ICSI cuando no sea necesaria.⁴⁵ Este tipo de revisiones ayuda a generar espacios de consenso para estandarizar protocolos de trabajo en los centros de fertilidad que orienten a una medicina personalizada basada en la evidencia en donde se aplique la técnica adecuada para cada diagnóstico.

REFERENCIAS

1. Edwards RG. Culture of human embryos in vitro. Acta Endocrinol Suppl (Copenh). 1972;166:131-34.
2. Vogel G, Enserink M. Nobel Prizes. Honor for test tube baby pioneer. Science 2010;330:158-59.
3. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992;340:17-18.
4. Palermo GD, O'Neill CL, Chow S, et al. Intracytoplasmic sperm injection: state of the art in humans. Reproduction 2017;154:F93-f110.
5. Neri QV, Lee B, Rosenwaks Z, et al. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Cell Calcium 2014;55:24-37.
6. Lewis S, Klonoff-Cohen H. What factors affect intracytoplasmic sperm injection outcomes? Obstet Gynecol Surv 2005;60:111-123.
7. Wang SS, Sun HX. Blastocyst transfer ameliorates live birth rate compared with cleavage-stage embryos transfer in fresh in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection cycles: reviews and meta-analysis. Yonsei Med J 2014;55:815-25.
8. Rosenwaks Z, Pereira N. The pioneering of intracytoplasmic sperm injection: historical perspectives. Reproduction 2017;154:F71-f77.
9. Ray PF. Predictable male causes of *in vitro* fertilization (IVF) with intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) failure. Gynecol Obstet Fertil 2010;38:114-18.
10. Hammoud I, Boitrelle F, Ferfour F, et al. Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates. Andrologia 2013;45:163-70.
11. Lo Monte G, Murisier F, Piva I, Get al. Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini-review. Asian J Androl 2013;15:608-15.
12. McDowell S, Kroon B, Ford E, et al. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. Cochrane Database Syst Rev 2014: Cd010461.
13. Cohen J, Fehilly CB, Fishel SB, et al. Male infertility successfully treated by *in-vitro* fertilisation. Lancet 1984;1:1239-40.
14. Johnson LN, Sasson IE, Sammel MD, Dokras A. Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. Fertil Steril 2013;100:704-11.
15. Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod 2017;32:1957-73.
16. Garcia JE, Rosenwaks Z. Development of in vitro fertilization in the United States: a conversation between Zev Rosenwaks and Jairo E. Garcia. Fertil Steril 2018;110:14-18.
17. Chambers GM, Paul RC, Harris K, et al. Assisted reproductive technology in Australia and New Zealand: cumulative live birth rates as measures of success. Med J Aust 2017;207:114-18.
18. Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Crosby JA, et al. Assisted reproductive techniques in Latin America: The Latin American Registry, 2013. JBRA Assist Reprod 2016;20:49-58.
19. Marchesi DE, Qiao J, Feng HL. Embryo manipulation and imprinting. Semin Reprod Med 2012;30:323-34.
20. Vermeiden JP, Bernardus RE. Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? Fertil Steril 2013;99:642-51.
21. Lacamara C, Ortega C, Villa S, et al. Are children born from singleton pregnancies conceived by ICSI at increased risk for congenital malformations when compared to children conceived naturally? A systematic review and meta-analysis. JBRA Assist Reprod 2017;21:251-59.
22. Lie RT, et al. Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods; a meta-analysis. Int J Epidemiol 2005;34:696-701.
23. Agha-Rahimi A, Khalili MA, et al. Vitriification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. Reprod Biomed Online 2014;28:352-58.
24. Mitchell V, Sigala J, Jumeau F, et al. ICSI treatment in severe asthenozoospermia. Gynecol Obstet Fertil 2012;40:776-79.
25. Rappa KL, Rodriguez HF, et al. Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? Biotechnol Adv 2016;34:578-87.
26. Teixeira DM, Barbosa MA, Ferriani RA, et al. Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. Cochrane Database Syst Rev 2013: Cd010167.
27. Carrell DT, Nyboe Andersen A, Lamb DJ. The need to improve patient care through discriminate use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and improved understanding of spermatozoa, oocyte and embryo biology. Andrology 2015;3:143-46.
28. Andersen NA, Carlsen E, Loft A. Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection marked variability between countries. Hum Reprod Update 2008;14:593-604.
29. Li Z, Wang AY, Bowman M, et al. ICSI does not increase the cumulative live birth rate in non-male factor infertility. Hum Reprod 2018;33:1322-30.
30. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. Reprod Biomed Online 2015;30:120-27.



31. Zagadailov P, Hsu A, Stern JE, Seifer DB. Temporal differences in utilization of intracytoplasmic sperm injection among US regions. *Obstet Gynecol* 2018;132:310-20.
32. Babayev SN, Park CW, Bukulmez O. Intracytoplasmic sperm injection indications: how rigorous? *Semin Reprod Med* 2014;32:283-90.
33. Katzorke T, Kolodziej FB. [Significance of insemination in the era of IVF and ICSI]. *Urologe A* 2010; 49:842-46.
34. Okohue JE, Onuh SO, Ikimalo JI. Comparison of IVF/ICSI outcome in patients with polycystic ovarian syndrome or tubal factor infertility. *Niger J Clin Pract* 2013;16:207-10.
35. van Rumste MM, Evers JL, Farquhar CM. ICSI *versus* conventional techniques for oocyte insemination during IVF in patients with non-male factor subfertility: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2004;19:223-27.
36. Setti AS, Figueira RC, Braga DP, et al. Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;159:364-70.
37. Setti AS, Braga DP, Figueira RC, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection results in improved clinical outcomes in couples with previous ICSI failures or male factor infertility: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;183:96-103.
38. Beydoun HA, Stadtmayer L, Beydoun MA, et al. Polycystic ovary syndrome, body mass index and outcomes of assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online* 2009;18:856-63.
39. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor infertility: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:1395-99.
40. Rubino P, Vigano P, Luddi A, Piomboni P. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Hum Reprod Update* 2016;22:194-227.
41. Dyer S, Chambers GM, de Mouzon J, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: Assisted Reproductive Technology 2008, 2009 and 2010. *Hum Reprod* 2016;31:1588-1609.
42. Adamson GD, de Mouzon J, Chambers GM, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011. *Fertil Steril* 2018;110:1067-80.
43. Boulet SL, Mehta A, Kissin DM, et al. Trends in use of and reproductive outcomes associated with intracytoplasmic sperm injection. *JAMA* 2015;313:255-63.
44. Borini A, Suriano R, Barberi M, et al. Oocyte donation programs: strategy for improving results. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1221:27-31.
45. Esteves SC, Roque M, Bedoschi G, et al. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nat Rev Urol* 2018;15: 535-62.
46. De La Torre A, Nikoloski Z, Mossialos E. Equity of access to maternal health interventions in Brazil and Colombia: a retrospective study. *Int J Equity Health* 2018;17:43.
47. Jain T, Gupta RS. Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection in the United States. *N Engl J Med* 2007;357:251-57.
48. Seifer DB, Wantman E, Sparks AE, et al. National survey of the Society for Assisted Reproductive Technology membership regarding insurance coverage for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2018;110:1081-1088.e1081.