

SIMPOSIO BIOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

SYMPOSIUM BIOLOGY IN ASSISTED REPRODUCTION

1. **Pregna** Medicina Reproductiva;
Consultor Laboratorio Reproducción
Asistida; Co-Director Programa
PGT; Departamento Docencia e
Investigación, Buenos Aires, Argentina

Financiamiento: a cargo del autor.

Conflictos de interés: no existen en el presente artículo.

Recibido: 12 mayo 2018

Aceptado: 19 mayo 2018

Correspondencia:

📍 Departamento Docencia e Investigación
Juncal 3490, 1425DGQ Buenos Aires,
Argentina

☎ +54 11 4834-1600

☎ +54 9 11 56 63 82 43

✉ cbisioli@pregna.com.ar

🌐 www.pregna.com.ar

Citar como: Bisioli C. ¿Cuál es la razón para hacer todo inyección intracitoplasmática de espermatozoides - ICSI? Rev Peru Ginecol Obstet. 2018;64(2):231-237. DOI: <https://doi.org/10.31403/rpgo.v64i2083>

¿Cuál es la razón para hacer todo inyección intracitoplasmática de espermatozoides - ICSI?

What is the reason to always perform intracytoplasmic sperm injection - ICSI?

Claudio Bisioli¹

DOI: <https://doi.org/10.31403/rpgo.v64i2083>

RESUMEN

El empleo de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides - ICSI sin atender las indicaciones originadas en los estudios previos a la pareja infértil ha conducido a que un número importante de clínicas de medicina reproductiva del mundo hagan un uso indiscriminado de la misma. La presente revisión analiza los motivos que condujeron a esto y plantea posibles respuestas o discusiones a este proceder.

Palabras clave. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides - ICSI; Fertilización *in vitro* - FIV; Falla de fertilización.

ABSTRACT

The use of intracytoplasmic sperm injection - ICSI without attending the findings from previous studies to the infertile couple has led to the indiscriminate use of this procedure in a significant number of clinics of reproductive medicine in the world. The present review analyses the reasons that led to this situation and raises possible answers or discussions to this proceeding.

Keywords: Intracytoplasmic sperm injection - ICSI; *In vitro* fertilization - FIV; Failed fertilization.



La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, por sus siglas en inglés y tal como se lo conoce mundialmente en la jerga profesional) no solo ha sido una revolución en la moderna medicina reproductiva, sino que ha probado ser una de las pocas técnicas que han subsistido exitosamente a la prueba del tiempo^(1,2). Bert Stewart decía, en la Conferencia Mundial de Alpha sobre micromanipulación del 2001, que el ICSI se había convertido en la ‘penicilina’ de la reproducción asistida y que se esperaba que todos los embriólogos sean ‘micro-cirujanos’. Un anuncio de oferta de trabajo decía, por esa misma época, que todos los aspectos de las técnicas de reproducción asistida humana, incluyendo ICSI, eclosión asistida y biopsia de embriones, serán considerados una ventaja.

Este indudable éxito en el tratamiento de la infertilidad masculina hizo que su práctica se extendiese: mientras que en el año 2000 la proporción de ciclos de ICSI que se realizaban a escala mundial era 47,6%, para el año 2010 ya representaba 66% (tabla 1)⁽³⁾.

En 2016, JLH (Hans) Evers, Editor en Jefe de la revista *Human Reproduction*, publicaba en junio de 2016⁽⁴⁾ las cifras del Informe Mundial ICMART sobre Tecnologías Reproductivas Asistidas (TRA) 2008-2010. En los tres años se habían iniciado casi 4,5 millones de ciclos de TRA (en los 61 países que aportaron datos). Esto dio como resultado más de un millón de bebés (25,7% de nacidos vivos por ciclo iniciado). Además, el informe proporcionaba puntos de referencia para los procedimientos de TRA, entre ellos que, si bien la FIV brinda mejores resultados que el ICSI en parejas con infertilidad no masculina, se realizaba aproximadamente el doble de ciclos de ICSI que de FIV. La incidencia de infertilidad masculina severa no podía explicar esta discrepancia. Las

diferencias regionales mostraban que en Asia se practicaba 1,4 veces más ICSI que IVF, en Norteamérica 2,7 más, en América del Sur 6 veces más y en el Medio Oriente 60 veces más. En Europa, las cifras variaban desde 0,8 a 1,1 en los países nórdicos hasta 9 veces más ICSI que FIV en España y un exceso de ICSI de 25 veces en Polonia. En los tres años bajo revisión, la ICSI en indicaciones inadecuadas había evitado que al menos 25 000 parejas se embaracen.

Paul Devroey, pionero de la ICSI, enunciaba por el 2013⁽⁵⁾ que habían nacido 2,5 millones de niños mediante ICSI desde 1992, que resultaba sorprendente que muchas clínicas utilizaran ICSI para todas las indicaciones -más aún cuando un estudio australiano advertía que existía mayor riesgo de defectos al nacer en las técnicas de TRA que en las concepciones naturales, especialmente en ICSI⁽⁶⁾- y que un 80% de ICSI significaba que existía una clara sobreindicación. En una mesa durante un congreso europeo, al ser invitado a brindar su comentario para dar apertura a un simposio, expresó que se abusaba de la ICSI (*ICSI is overused*).

Esta contundente afirmación nos lleva a hacernos la siguiente pregunta: ¿Quiénes son los que inicialmente se benefician con el ICSI? Sin duda aquellos pacientes con:

- Graves déficits en la calidad del semen (oligozoospermia, astenozoospermia y teratozoospermias severas)
- Azoospermia obstructiva
- Azoospermia no obstructiva
- Un ciclo de FIV previo que había resultado en fertilización fallida o muy pobre.

Con el paso de los años, las posibles indicaciones se extendieron un poco más, y a las 4 principales debimos agregar las siguientes:

- Anormalidades ultra-estructurales, Síndrome de Kartagener
- Globozoospermia
- Ausencia congénita de los vasos deferentes
- Vasectomía

Tabla 1. FIV e ICSI en años recientes. REPORTE MUNDIAL ICMART (INTERNATIONAL COMMITTEE ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES)⁽³⁾.

Año	Proporción de ciclos de ICSI (%)
2000	47,6
2002	56,6
2004	60,6
2005	62,9
2006, 2007, 2008, 2009, 2010	66



- Obstrucción inflamatoria de los vasos deferentes
- Disfunción eyaculatoria
- Eyaculación retrógrada
- Pacientes parapléjicos
- Factores inmunológicos
- Pacientes oncológicos
- *Preimplantation genetic screening* – PGS o *preimplantation genetic diagnosis* – PGD con *polymerase chain reactions* – PCR/*comparative genomic hybridization* – CHG/*next generation sequence*- NGS
- Ovocitos vitrificados.

Hoy, las clínicas de TRA que aplican ICSI en todos sus casos representan la mayoría, independientemente de la indicación original de infertilidad. Los argumentos a favor de hacer todo ICSI son los siguientes:

- Se obtienen mejores resultados y mejor tasa de fertilización con ICSI que con FIV.
- Se obtienen mejores resultados especialmente en aquellos casos con pocos ovocitos.
- Hay menor riesgo de contaminación bacteriana.

En adelante, se discute estas indicaciones.

CON ICSI SE OBTIENEN MEJORES RESULTADOS Y MEJOR TASA DE FERTILIZACIÓN

Durante el Taller de Redlara en Buenos Aires⁽⁷⁾, del 6 al 7 de septiembre de 2012, el Dr Marius Meintjes, del *Frisco Institute for Reproductive Medicine*, Texas, EE. UU., se refirió a cómo mejorar los resultados en un programa de reproducción asistida. Cuando analizó 300 casos, las tasas de embarazo mediante FIV o ICSI fueron similares (alrededor de 47%), pero cuando consideró 3 000 casos en lugar de 300, la tasa de embarazo por ICSI (54%) fue significativamente inferior a la conseguida con FIV (57%). Es verdad que lo que sea significativo estadísticamente no tiene por qué ser significativo clínicamente, pero al menos sus datos nos informan que, con ICSI, Meintjes no conseguía mejores resultados.

Bhattacharya y colaboradores, en 2001⁽⁸⁾, reportaron los resultados de un importante estudio multicéntrico donde 415 parejas de 4 centros del Reino Unido fueron asignadas aleatoriamente a FIV o ICSI (435 ciclos de tratamiento: 224 FIV y 211 ICSI). La tasa de implantación fue mayor en el grupo de FIV que en el grupo de ICSI (95/318 [30%] frente a 72/325 [22%]); la tasa de embarazo por ciclo también fue mayor después de la FIV (72 [33%] vs 53 [26%]); más aún, el tiempo promedio de trabajo del laboratorio fue significativamente menor con FIV que con ICSI (22,9 vs 74,0 minutos). La conclusión fue que el ICSI no ofrecía ninguna ventaja sobre la FIV en términos de resultados clínicos en casos de infertilidad no masculina y que por lo tanto reservaban la práctica de ICSI solo para problemas severos del factor masculino.

En 2016, a Grimstad y sus colaboradores⁽⁹⁾ se les presentó una inmejorable oportunidad de averiguar si los resultados mejoraban con ICSI. En la base de datos de la *Society for Assisted Reproductive Technology* - SART encontraron, luego de eliminar del análisis los casos de factor masculino, que se habían reportado 3 956 ciclos de FIV convencional y 3 189 ciclos de ICSI, realizados en primeros ciclos con ovocitos frescos de mujeres cuyo único diagnóstico era ligadura de trompas. Luego de ajustar los factores de confusión relativos al año de tratamiento, edad, etnia, gravidez previa, número de ovocitos recuperados, día de la transferencia del embrión y número de embriones transferidos, las conclusiones fueron que el uso de ICSI no mostró mejora significativa en la tasa de fertilización y dio como resultado unas tasas de embarazo y nacidos vivos más bajas que con el uso de FIV convencional.

A nivel mundial, las conclusiones son semejantes. El Reporte Mundial del *International Committee Monitoring Assisted Reproductive Technologies* - ICMART del 2016 informó que las tasas de embarazo y de nacidos vivos por aspiración folicular eran similares entre FIV e ICSI⁽³⁾.

CASOS CON POCOS OVOCITOS

En el año 2011, el equipo de Marlana Duke en New Jersey⁽¹⁰⁾ fue el primero en abordar la pregunta: ¿debería recomendarse ICSI rutinariamente en pacientes con cuatro o menos ovocitos recuperados? El propósito de estos autores era determinar si los pacientes con una respuesta



baja a la estimulación ovárica controlada se beneficiaban con un ICSI. Analizaron retrospectivamente 350 ciclos en los que se recuperaron cuatro o menos ovocitos, excluyendo del análisis los casos de factor masculino severo y comparando inseminación *in vitro* convencional con ICSI en cuanto a tasa de fertilización, implantación, embarazo clínico por transferencia de embriones, y pérdida de embarazo. No encontraron diferencias en ninguno de los parámetros analizados, lo que llevó a los autores a concluir que sus resultados demostraban que, en presencia de parámetros seminales normales, un número bajo de ovocitos no era indicación válida para hacer ICSI. Sus resultados se muestran en la tabla 2.

En nuestra propia experiencia⁽¹¹⁾, se analizó 128 casos con ≤ 3 ovocitos maduros, de los cuales se practicó ICSI a 68 e inseminamos mediante FIV convencional a 56. En 17 de los casos de FIV aún contando con 1 solo ovocito, hubo 6 en que no fertilizó ese único ovocito y 11 en que sí fertilizó. En los 17 casos con 2 ovocitos, hubo solo 3 casos en que no fertilizó ninguno de los dos, 4 en que fertilizó uno de los dos y 10 casos en que fertilizaron los dos únicos ovocitos. Y en los 22 casos en que hubo 3 ovocitos totales, en uno solo no hubo fertilización, en otro fertilizó un ovocito de los 3 disponibles, en 2 casos fertilizaron dos de tres y en los 17 casos restantes fertilizaron normalmente todos los ovocitos, o sea 3 de 3 inseminados mediante FIV convencional. Ninguno de estos valores difería de lo obtenido con los 68 casos en que se eligió ICSI como técnica de fecundación.

Un reporte de la Sociedad Estadounidense para las Tecnologías de Reproducción Asistida (SART, por sus siglas en inglés), luego de analizar 8 597 ciclos con FSH elevada y 38 926 ciclos con disminución de la reserva ovárica como principal diagnóstico, realizados entre 2004 y 2011, con-

cluía en que tanto el ICSI como la eclosión asistida no estaban asociados a una mayor tasa de nacidos vivos⁽¹²⁾.

CON ICSI HAY UN MENOR RIESGO DE CONTAMINACIÓN BACTERIANA

Existen muy pocas publicaciones relacionadas al importante aspecto de la contaminación bacteriana. Ben-Chetrit y col.⁽¹³⁾ reportaron 5 casos con levaduras en 729 ciclos observados (0,69%), Cotel y col.⁽¹⁴⁾ hallaron que 6 de sus casos contenían contaminación microbiana en 1 691 ciclos realizados (0,35%), mientras que Kastrop y col.⁽¹⁵⁾ encontraron en 8 años 95 infecciones en 13 977 ciclos (0,68%). Los tres reportes coincidían en que la incidencia era muy baja y todas las infecciones habían sido observadas en placas de FIV y ninguna en ICSI.

Al preguntarse sobre el porqué de esta diferencia, las posibles razones esgrimidas fueron las siguientes:

- La selección de un solo espermatozoide en ICSI podía colaborar en ‘arrastrar’ una menor carga bacteriana que una masiva inseminación convencional de espermatozoides.
- Lo mismo podía estar sucediendo con la remoción de las células del *cumulus* y la corona del ovocito; de hecho, la hialuronidasa es de uso habitual en veterinaria para descontaminar envíos comerciales de embriones criopreservados de animales con valor ganadero⁽¹⁶⁾.

Sin embargo, Anthony Chan y sus colaboradores encontraron en el 2000⁽¹⁷⁾ que espermatozoides de monos Rhesus con ADN exógeno de plásmidos unidos a sus membranas era transmitido transgénicamente a los embriones resultantes luego de haberlos inyectado en ovocitos mediante ICSI, planteando entonces la inquietud de que la ICSI también podría transmitir material infeccioso, y a un nivel quizás más preocupante.

¿QUÉ PODEMOS ENTONCES DECIR, ADEMÁS DE TODO LO ANTERIOR, EN CONTRA DE HACER TODO ICSI?

En primer lugar, el valor actual de la morfología según el criterio estricto está más que cuestionado. En la opinión general el criterio estricto no es un criterio para elegir al ‘mejor’ espermatozoide sino

TABLA 2. COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE FIV E ICSI EN PACIENTES CON RESPUESTA BAJA A LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA⁽¹⁰⁾.

Resultados	FIV	ICSI
No, de ovocitos recuperados	3,3	3,3
Tasa de fecundación por ovocito recuperado (%)	51,5	51,8
Tasa de implantación (%)	22	25
Tasa de embarazo clínico por transferencia (%)	32,8	33,3
Tasa de aborto (%)	26,7	39,5
Tasa de cancelación de ciclos	23,5	24,6



la capacidad de la zona pelúcida de seleccionar el espermatozoide superior. El ICSI entonces estaría anulando la capacidad de selección 'natural' de la zona pelúcida⁽¹⁸⁾. Más aún, según Keegan⁽¹⁹⁾, la teratozoospermia como única causa de infertilidad no afecta los resultados de reproducción asistida y no sería una indicación para ICSI. Check y cols.⁽²⁰⁾ ya habían ido un paso más allá cuando sugirieron que el uso de ICSI podía incluso disminuir la chance de embarazo comparada con embriones formados mediante FIV, demostrando que en mujeres con reserva normal el riesgo de no tener embriones para transferir fue de solo 1,9% con FIV vs 1,5% con ICSI.

Más aún, el ICSI conlleva un riesgo aumentado de defectos congénitos, según quedó demostrado por el importante estudio que comparó la población general australiana con dos clínicas en la provincia de Australia del Sur con 308 974 nacimientos de TRA entre 1986 y 2002 y con un seguimiento asombroso del 99,9% de los nacimientos en el registro de nacimientos del estado⁽⁶⁾. Los autores aclaraban, como si fuese necesario, que 'la pérdida de información fue mínima'. Luego de independizar los datos de las variables parentales de confusión relacionadas a la edad, paridad previa, sexo del nacido, año de nacimiento, etnicidad, país, condición materna, hábito de fumar, ocupación, nivel económico, multiparidad y tipo de tratamiento, estos autores demostraron que existía un mayor riesgo de defectos al nacer en TRA que en las concepciones naturales, especialmente en ICSI.

Nuevamente, según Marius Meintjes, durante el Taller de REDLARA (Red Latinoamericana de Reproducción Asistida) dictado en 2012 en Buenos Aires⁽⁷⁾, era lícito preguntarse si el ICSI era una técnica 'benigna', ya que:

- implicaba una tasa de degeneración de 5%,
- había ICSIs 'malos' o 'difíciles' donde este número podía ser aún mayor,
- la exposición exagerada a la hialuronidasa o el tratamiento brusco podía llevar a una activación partenogenética o al cambio de posición del primer cuerpo polar (según quedaba demostrado por las imágenes obtenidas mediante la óptica Polscope) y con ello a una falsa ubicación de la placa metafásica, indispensable para tratar de evitarla y no dañarla durante la inyección,

- un número significativamente menor de cigotos provenientes de FIV tienen vacuolas en comparación con los que provienen de ICSI. Este resultado sugiere una influencia directa del procedimiento de ICSI (cuando se inyecta el espermatozoide) que podría conducir a una encapsulación de PVP en la célula⁽²¹⁾.

Por lo tanto, su conclusión era que el ICSI no es para todos los casos, que decididamente no es para factor femenino o factor ovocitario, es más caro, consume más tiempo y conlleva riesgos. 'El ICSI no es gratuito', afirmaba.

El informe ICMART del 2013⁽²²⁾ analizó los casos mundiales de TRA realizados en el 2005 (lleva tiempo reunir y analizar toda la información). Al comprobar que la proporción de casos de ICSI ya alcanzaba 63%, finalizaba con las siguientes recomendaciones:

- La ICSI puede requerir justificación adicional para su uso en otras causas de infertilidad.
- Hay una falta de acuerdo internacional acerca de los beneficios de usar ICSI cuando la fecundación tradicional debería haber sido la primera línea de tratamiento.

La opinión de la Sociedad Estadounidense de Medicina Reproductiva (ASRM, en sus siglas en inglés), en 2012⁽²³⁾, acerca del uso del ICSI en los casos que no involucran un factor masculino se encuentra, a 6 años de su emisión, completamente vigente:

- La ICSI es una terapia segura y efectiva para el tratamiento de la infertilidad masculina.
- La ICSI puede aumentar las tasas de fertilización cuando es menor a lo esperado o ha ocurrido previamente una falla de fertilización con inseminación convencional, aunque en la mayoría de los casos esto esté más relacionado con una mala estimulación ovárica (por ejemplo, en los casos de inmadurez citoplasmática).
- La ICSI para la infertilidad inexplicada no mejora los resultados clínicos.
- La ICSI para bajo rendimiento de ovocitos y edad materna avanzada no mejora los resultados clínicos.



- El uso rutinario de ICSI puede disminuir la incidencia de fertilización fallida inesperada; sin embargo, más de 30 parejas tendrían que someterse a ICSI innecesariamente para evitar una fecundación fallida.
- La ICSI puede ser beneficiosa para pacientes sometidos a FIV con PGT, ovocitos madurados *in vitro* y ovocitos criopreservados.
- Debe considerarse la seguridad y el costo de ICSI en el contexto de factores de infertilidad de origen no masculino.

Finalmente se puede afirmar que, en nuestra experiencia, una vez que se ha acordado una decisión institucional con respecto a la estrategia de hacer ICSI solo en los casos estrictamente necesarios, contando con un fundamento científico sólido, siempre y cuando los valores de movilidad y cantidad espermática y los antecedentes de la pareja lo ameriten (por ejemplo, que no haya habido una falla previa) y haya además una buena comunicación de sus pros y contras a los pacientes, los buenos resultados y la comprensión de los pacientes acompañan esa decisión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Steirteghem A. What next for assisted reproductive technology? A plea for an evidence-based approach. *Hum Reprod.* 2008;23(12):2615-6.
2. Harper J, Jackson E, Sermon K, Aitken RJ, Harbottle S, Mocanu E, Hardarson T, Mathur R, Viville S, Vail A, Lundin K. Adjuncts in the IVF laboratory: where is the evidence for 'add on' interventions? *Hum Reprod.* 2017;32(3):485-91. doi: 10.1093/humrep/dex004.
3. Dyer S, Chambers GM, de Mouzon J, Nygren KG, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Banker M, Adamson GD. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: Assisted Reproductive Technology 2008, 2009 and 2010. *Hum Reprod.* 2016;31(7):1588-609. doi: 10.1093/humrep/dew082.
4. Evers J LH. Santa Claus in the fertility clinic. *Hum Reprod.* 2016;31(7):1381-2. doi: 10.1093/humrep/dew092.
5. Paul Devroey. Interview. *Focus in Reproduction.* 2013:19.
6. Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, Van Essen P, Priest K, Scott H, Haan EA, Chan A. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Engl J Med.* 2012;366:1803-13. doi: 10.1056/NEJMoa1008095.
7. Meintjes M. Cómo mejorar los resultados en un programa de reproducción asistida (disertación). Buenos Aires (Argentina): Taller de Redlara, 2012.
8. Bhattacharya S, Hamilton MPR, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, Ghobara T, Braude P, Kennedy R, Rutherford A, Hartshorne G, Templeton A. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2001;357:2075-9.
9. Grimstad FW, Nangia AK, Luke B, Stern JE, and Mak W. Use of ICSI in IVF cycles in women with tubal ligation does not improve pregnancy or live birth rates. *Hum Reprod.* 2016;31(12):2750-5.
10. Luna M, Bigelow C, Duke M, Ruman J, Benjamin Sandler B, Grunfeld L, Copperman AB. Should ICSI be recommended routinely in patients with four or fewer oocytes retrieved? *J Assist Reprod Genet.* 2011;28:911-5. doi: 10.1007/s10815-011-9614-9.
11. Bisioli C, Gómez Peña M, Papayannis M, De Martino E, Grand Martin C, González A. ICSI en casos con menos de 3 ovocitos como indicación: ¿es justificable? *Actas del XVI Congreso Argentino de Medicina Reproductiva; 2014 Noviembre 11-14; Buenos Aires, Argentina.*
12. Butts SF, Owen C, Mainigi M, Senapati S, Seifer DB, Dokras A. Assisted hatching and intracytoplasmic sperm injection are not associated with improved outcomes in assisted reproduction cycles for diminished ovarian reserve: an analysis of cycles in the United States from 2004 to 2011. *Fertil Steril.* 2014;102(4):1041-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.06.043.
13. Ben-Chetrit A, Brooks B, Shen O, Haran E, Geva-Eldar T, Margalioth EJ. Transfer of embryos from yeast-colonized dishes. *Fertil Steril.* 1996;66(2):335-7.
14. Cattel E, Medhat Fawzy M, Cafferkey M, Harrison RF, McMorrow J, Lennon B. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. *Fertil Steril.* 1996;66(5):776-80.
15. Kastrop PMM, de Graaf-Miltenburg LAM, Gutknecht DR, Sjerp M, Weima SM. Microbial contamination of embryos cultures in an ART laboratory: sources and management. *Hum Reprod.* 2007;22(8):2243-8.
16. Bureau M, Dea S, Sirard MA. Evaluation of virus decontamination techniques for porcine embryos produced in vitro. *Theriogenology.* 2005;63:2343-55.
17. Chan AWS, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. *Mol Human Reprod.* 2000;6(1):26-33.
18. Check JH. ICSI may have disadvantages (letter). *Fertil Steril.* 2008;89:1844-5.
19. Keegan BR, Barton S, Sanchez X, Berkeley AS, Lewis C, Krey LC, Grifo J. Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2007;88(6):1583-8.
20. Check JH, Bollendorf D, Wilson C, Summers-Chase D, Horwath D, Yuan W. A retrospective comparison of pregnancy outcome following conventional oocyte insemination vs intracytoplasmic sperm injection for isolated abnormalities in sperm morphology using strict criteria. *J Androl.* 2007;28(4):607-11.
21. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Klaus Jesacher K, Tews G. Occurrence and developmental consequences of vacuoles through



- ghout preimplantation development. *Fertil Steril.* 2005;83(6):1635-40.
22. Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson D, de Mouzon J, Nygren KG, Sullivan EA. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2005. *Fertil Steril.* 2014;101(2):366-78.
23. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor infertility: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2012;98(6):1395-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.026.