

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA

Y

TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Efecto del ácido hialurónico, en la inyección
espermática intracitoplásmica, sobre la tasa de
aborto y embarazo

TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR

Estela Fernández Alegre

JUNIO 2012

Deseo expresar mis agradecimientos a todo el equipo de la Unidad de Reproducción Asistida del HUCA, por estar siempre dispuestos a ayudarme y hacerme sentir una más en mis horas por allí.

Especialmente al Dr. Abel Gayo Lana, por dirigir este trabajo y poner todo de su parte para la elaboración del mismo. Por hacer que los ratos de duro trabajo (recogiendo datos) fueran amenos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
III. MATERIAL Y MÉTODOS	11
III.1 Obtención de ovocitos	11
III.2 Obtención y procesamiento de espermatozoides	12
III.3 ICSI con PVP frente a ICSI con AH	13
III.4 Valoración de la fertilización y calidad embrionaria	14
III.5 Transferencia embrionaria	14
III.6 Diagnóstico de embarazo y aborto	15
III.7 Estudios	15
III.8 Análisis estadístico	16
IV. RESULTADOS	17
IV.1 Primer abordaje	17
IV.2 Segundo abordaje	18
IV.3 Estudio conjunto	19
V. DISCUSIÓN	22
VI. CONCLUSIONES	25
VII. BIBLIOGRAFÍA	26

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el término infertilidad como la incapacidad de conseguir embarazo o que éste no llegue a término, en aquellas parejas que llevan más de un año manteniendo relaciones sexuales coitales sin medidas de anticoncepción. Actualmente la infertilidad afecta alrededor del 10-15% de la población en edad reproductiva y la tendencia de ésta cifra va en aumento. En España en particular, se traduce en más de 800.000 parejas y aparecen alrededor de 16.000 casos nuevos al año. Se estima que los problemas de fertilidad de la mujer o infertilidad femenina suponen el motivo del 40% de los casos de parejas con problemas para conseguir embarazo a término, mientras que los problemas de fertilidad del hombre o infertilidad masculina suponen otro 40%. Aproximadamente el 20% del total de casos de infertilidad no tienen asociada ninguna patología conocida. El incremento de la infertilidad es común en todos los países desarrollados, poniendo de manifiesto que no sólo intervienen sobre ella factores físicos o genéticos, sino que tienen gran importancia los factores socio-culturales, además de los emocionales, psicológicos... Por la gran repercusión de la infertilidad a nivel mundial, en 2009 la OMS junto con el Comité Internacional para la Supervisión de las Técnicas de Reproducción Asistida (ICMART) reconocieron oficialmente la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductor (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). La reproducción asistida y el conjunto de técnicas asociadas a ella, ayudan a la reproducción humana en los casos con problemas de infertilidad. Clínicamente, los pacientes con infertilidad de origen desconocido suponen un reto en la reproducción asistida, ya que entraña mayor dificultad decidir que técnica de reproducción asistida (TRA) será la mejor opción para conseguir un embarazo con el mínimo coste y riesgo posibles.

A lo largo de los años, se ha extendido el uso de TRA como tratamiento para la infertilidad. La experimentación con animales ha sido muy importante en el desarrollo de dichas técnicas. Hacia 1785 el doctor John Hunter consiguió el nacimiento de un niño sano tras realizar las primeras inseminaciones artificiales (IA) en humanos. La IA consiste en la introducción médica del semen o esperma en el tracto genital femenino, ya sea la vagina, cérvix, útero o trompas de Falopio, con la finalidad de conseguir una gestación (Hanson *et al.*, 1951). De modo que la fecundación del ovocito se produce en

el sistema reproductor femenino. Esta técnica llevaba años aplicándose como práctica habitual con animales, incluso se tiene constancia de que se realizaba en el siglo XIV por los árabes para mejorar la raza de los caballos. Alrededor de 1884 se comenzaron a realizar IA con semen de donante. Hubo que esperar unos años más para la realización de la fecundación in vitro (FIV), consistente en la extracción de ovocitos femeninos para fecundarlos fuera del organismo de la mujer con espermatozoides obtenidos previamente del hombre. Y posteriormente se realiza la transferencia embrionaria (TE) ya que tras ser fertilizados, los embriones se depositan en el útero de la mujer. Fue en 1978 cuando nació la primera niña en el mundo tras la realización de lo que conocemos hoy por FIV clásica, en la que los ovocitos extraídos se incuban durante horas en un medio líquido que contiene espermatozoides, y tras la fecundación se realiza TE (Stephoe, 1978), marcando un hito histórico en la reproducción asistida.

Pero sin lugar a dudas, la inyección intracitoplásmica del espermatozoide (ICSI) fue la aportación más revolucionaria en este campo, tras el nacimiento del primer niño por esta técnica en 1992 (Palermo *et al.*, 1992). La ICSI consiste en la inyección intraovocitaria directa de un único espermatozoide viable, surgió a partir de dos técnicas que comenzaban a investigarse pero que no se utilizaban de forma rutinaria: la disección parcial de la zona (PZD), mediante la realización de un pequeño agujero en la zona pelúcida (ZP) del ovocito para facilitar la entrada del espermatozoide (Cohen *et al.*, 1989) y la inserción espermática subzonal (SUZI) consistente en la inyección de uno o varios espermatozoides a través de la ZP y deposición en el espacio perivitelino (Fishel *et al.*, 1991). La base de todas estas técnicas (PZD, SUZI e ICSI) está en sobrepasar la ZP del ovocito, que ejerce de barrera entre el propio ovocito y el espermatozoide, para aumentar las tasas de fertilización. De este modo, la ICSI ha permitido la fertilización en casos donde el uso repetido de la FIV convencional ha fallado y sobre todo en casos de factor masculino severo, en los cuales no se obtienen resultados exitosos con técnicas de inseminación convencional. Con ésta técnica de micromanipulación se aumentó la eficiencia y mejoraron los resultados en reproducción asistida, obteniendo incluso tasas de embarazo superiores al 30% (Van Steirteghem *et al.*, 1993). Pero a pesar de las numerosas mejoras en el campo de la reproducción, son relativamente bajas las tasas de niños nacidos vivos por estas técnicas (Wright *et al.*, 2008).

La inmovilización del espermatozoide para su captura individual y posterior inyección en el ovocito, en la técnica ICSI, se puede llevar a cabo gracias a diferentes métodos, como por ejemplo mediante láser (Montag *et al.*, 2000; Ebner *et al.*, 2001; 2002), sonicación, enfriamiento, tratamiento con detergentes y pulsos piezo-accionados (Mizuno *et al.*, 2002). Sin embargo, el método que más extensamente se practica, no requiere equipamiento especial, simplemente es reducir la motilidad de los espermatozoides introduciéndolos en un medio viscoso antes de marcar la cola del espermatozoide con la pipeta para inmovilizarlo completamente (Van Steirteghem *et al.*, 1993). En este caso, el producto ideal debe ser suficientemente viscoso para disminuir la motilidad de los espermatozoides, pero a la vez ser suficientemente fluido para aspirar fácilmente el espermatozoide con muy poco medio, debe evitar que los espermatozoides se peguen a la placa o pipeta, y no debe presentar efectos deletéreos en el cigoto (Balaban *et al.*, 2003). Anteriormente, la mayoría de productos comerciales para disminuir la motilidad de los espermatozoides contenía polivinilpirrolidona (PVP), por este motivo fue un producto utilizado de manera rutinaria en los laboratorios de reproducción asistida y que aún se utiliza extensamente para ICSI. Aunque en los últimos años, se está cuestionando el uso de éste plástico sintético, PVP, en la reproducción asistida.

El PVP, de fórmula química C_6H_9NO , es un polímero vinílico ramificado, sintetizado por primera vez en 1939 por el profesor Walter Reppe a partir del monómero N- vinilpirrolidona. El nombre propuesto por IUPAC es poli [1 - (2-oxo-1-pirrolidinil) etileno]. El PVP es soluble en agua y otros solventes polares. En seco es un polvo escamoso, que absorbe fácilmente hasta un 40% de su peso en agua de la atmósfera. En solución, tiene excelentes propiedades humectantes y forma fácilmente películas. Estas propiedades han permitido que su uso se extienda en los distintos ámbitos.

Comenzó aplicándose como expansor del plasma sanguíneo en víctimas de trauma, y más tarde presentó una amplia variedad de aplicaciones en medicina y farmacia: como lubricantes oftalmológicos, en inyecciones subcutáneas como vehículo

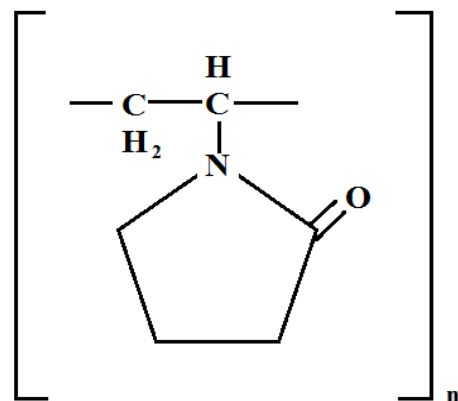


Figura 1: Estructura química del PVP

o retardante por ejemplo para la estimulación hormonal del folículo (Kanayama *et al.*, 1994). También se utilizó como aglutinante en comprimidos farmacéuticos o como desinfectante en solución yodada, entre otras. El PVP aparece en cosmética y producción industrial, como por ejemplo en las barras de pegamento, tintas, pinturas, champús, cremas dentales, adhesivos de los sellos, en soluciones para lentes de contacto, en fijadores, spray y un largo etcétera. Como aditivo alimenticio, el PVP es un estabilizador con código E1201, muy utilizado por la industria de la bebida, por sus formas complejas con fenoles mejora la claridad de la cerveza y el vino (Jean *et al.*, 2001). En biología molecular, el PVP puede ser utilizado como un agente de bloqueo durante el análisis Southern blot (método de detección de una determinada secuencia de ADN) como un componente de la solución buffer Denhardt (solución reguladora de pH). También es excepcionalmente bueno en la absorción de los polifenoles durante la purificación del ADN. Los polifenoles son comunes en muchos tejidos vegetales y pueden desactivar las proteínas si no se elimina y por lo tanto inhibir muchas reacciones posteriores como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Y en microscopía, la PVP es útil para hacer un medio de montaje acuoso.

A pesar del extenso uso del PVP, se han observado numerosos efectos nocivos, ya que el tratamiento cutáneo o subcutáneo, puede causar inflamación, abscesos, granulomas, pseudotumores e hinchazón muscular. Después de la administración intravenosa, puede producir depósitos en osteocitos y consecuentemente fracturas de hueso. Las lesiones producidas en la piel, riñón, hígado y bazo, se deben a que son estructuras implicadas en el almacenamiento o depósito de PVP tras su administración. En las células que almacenan PVP, su anormal acumulación presenta un problema patológico, y da lugar a alteraciones mucosas como resultado de la interacción entre éste agente y el citoplasma de la célula (Kepes *et al.*, 1993).

Además de las aplicaciones anteriormente descritas, en los laboratorios de reproducción asistida, el PVP se ha utilizado no solo en la micromanipulación de espermatozoides para realizar ICSI, también aparece en pequeñas dosis en un medio comercial, de baja densidad de nombre Percoll. Este medio comercial se utilizó en reproducción humana, ahora ya sólo se utiliza en reproducción animal, como agente selector de espermatozoides y como crioprotector para la criopreservación tanto de embriones (Titterington *et al.*, 1995) como de espermatozoides (De Leeuw *et al.*, 1993). Los efectos del PVP sobre la estructura y función de los gametos han sido

controvertidos a lo largo del tiempo. Ha demostrado estabilizar la membrana plasmática del espermatozoide (Dozortesev *et al.*, 1995), así como retrasar las oscilaciones de calcio en el ovocito por la penetración del espermatozoide, previniendo la descondensación nuclear y lesiones en el ADN (Ray *et al.*, 1995). Por el contrario, otros estudios ponen de manifiesto los efectos nocivos del PVP, causando alteraciones submicroscópicas en el espermatozoide (Strehler *et al.*, 1998) ya que disminuye la integridad de la membrana del espermatozoide (De Leeuw *et al.*, 1993), interacciona con la membrana mitocondrial y con la membrana acrosomal, iniciando la reacción acrosomal. Como consecuencia por este desajuste en las membranas del espermatozoide, se ha observado que en gran parte la estructura nuclear aparece dañada, con acusado deterioro de la cromatina en los espermatozoides expuestos al polímero (Barak *et al.*, 2001), formando parte de un proceso necrótico. Los efectos nocivos en el ovocito no han sido extensamente investigados, pero se observó que causaba efectos tóxicos en los ovocitos de ratón (Bras *et al.*, 1994; Mizuno *et al.*, 2002). Además, PVP que es inyectado en el ovocito junto con el espermatozoide, no puede ser expulsado al exterior del ovocito, ni digerido por encima lisosomales, sino que permanece en el interior de éste durante un periodo de tiempo prolongado (Jean *et al.*, 2001). Consecuentemente, numerosos grupos han desarrollado otros métodos para la realización de ICSI sin la utilización de PVP (Jean *et al.*, 1996; Hlinka *et al.*, 1998; Huszar *et al.*, 2000; Barak *et al.*, 2001; Balaban *et al.*, 2003). Muchos de ellos proponen como alternativa al PVP el uso de ácido hialurónico (AH), componente natural del complejo cúmulo- ovocito (Huszar *et al.*, 1999; Barak *et al.*, 2001).

El AH es un polisacárido del tipo de glucosaminoglucanos con enlaces β , su textura es viscosa y presenta función estructural. Está constituido por cadenas de carbohidratos complejos, en concreto unos 50.000 disacáridos de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico por molécula. Esta cadena se sitúa formando espirales con un peso molecular medio de 2 a 4 millones. Presenta la propiedad de retener grandes cantidades de agua y de adoptar una conformación extendida en disolución, por lo que son útiles a la hora de acojinar o lubricar. Estas propiedades se consiguen gracias al gran número de grupos OH y de cargas negativas de esta molécula, lo que permite, por el establecimiento de fuerzas de repulsión, que se conserven relativamente separadas entre sí las cadenas de carbohidratos.

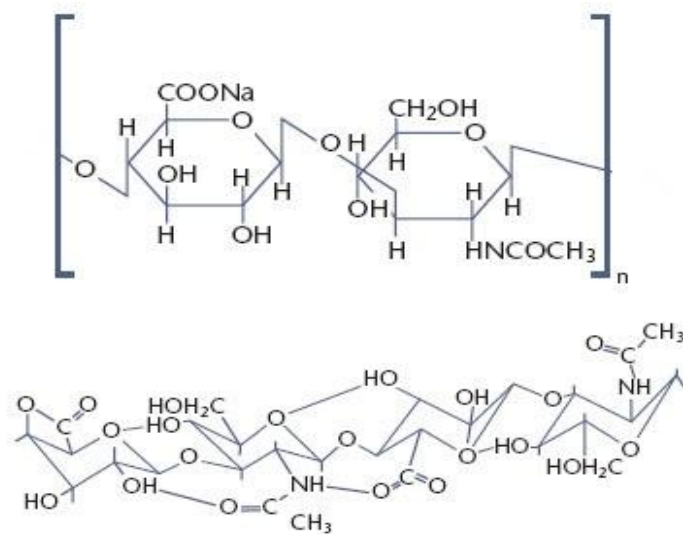


Figura 2: Estructura química del ácido hialurónico en su forma de sal sódica.

El AH aparece en la sinovia, humor vítreo y tejido conjuntivo colágeno de numerosos organismos y es una importante glicoproteína en la homeostasis articular. En seres humanos destaca su concentración en las articulaciones, los cartílagos y la piel. Además es un componente del moco cervical, del cúmulo y del fluido folicular (Cayli *et al.*, 2003). Fue descubierto en 1934 por Karl Meyer y John Palmer, que lograron aislarlo a partir del cuerpo vítreo de los ojos de las vacas. Aunque fue Endre Balazs quien llevó a cabo la mayor parte de los descubrimientos sobre AH, además de patentarlo y utilizarlo con fines comerciales. Actualmente su uso está muy extendido. La cosmética es el sector de mayor demanda, al poseer la capacidad de retener agua se emplea para hidratación de la epidermis, así como para prevenir arrugas ya que reconstituye las fibras de colágeno que sostienen los tejidos de la piel. En farmacia se utiliza como cicatrizante, bajo el código D03AX05 del Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica y Química (ATC), instituido por la OMS. También se aplica en la viscosuplementación o como tópico en sesiones de mesoterapia y como suplemento nutricional para las articulaciones. Pero el uso principal en medicina es como material de relleno en cirugía y odontología estética.

En reproducción asistida, el interés por el AH no sólo viene determinado porque las características del compuesto permiten preparar soluciones con la viscosidad adecuada para realizar ICSI, sino porque además juega un papel importante en la

fertilización humana natural. El grupo de Jakab fue el primero en publicar el uso del AH como método de selección de espermatozoides sanos para ICSI (Jakab *et al.*, 2005). Se basa en la teoría de que el AH es el mayor constituyente de la matriz extracelular del cúmulo-ovocito y que juega un papel crítico en la selección fisiológica del espermatozoide, es decir, en la selección de espermatozoides maduros y funcionalmente competentes durante la fertilización *in vivo* (Petersen *et al.*, 2010). La matriz extracelular es una excelente barrera que sólo permite el paso de espermatozoides maduros, que tienen receptores específicos para unirse y digerir el AH, pudiendo alcanzar y penetrar de este modo la ZP para fertilizar el ovocito (Parmegiani *et al.*, 2010). De modo, que los espermatozoides que pueden unirse permanentemente al AH *in vitro*, son espermatozoides que han completado el proceso espermiogénico de remodelación de la membrana plasmática, extrusión citoplasmática y maduración nuclear (Huszar *et al.*, 2003). Estos espermatozoides que han completado su estado madurativo, presentan mayor densidad de receptores CD44 para AH. De hecho, en la maduración espermática normal, la elongación de espermátidas bajo la extrusión citoplasmática y la remodelación de la membrana plasmática, lleva a la formación de sitios de unión para AH y ZP. Por el contrario, en espermatozoides inmaduros con deficiente remodelación de la membrana citoplasmática no tienen capacidad para unirse al AH (Cayli *et al.*, 2003), es decir, los espermatozoides con maduración incompleta, tienen deficientes receptores de unión con la ZP y AH.

La integridad estructural de la cromatina espermática juega un papel muy importante en la fertilización humana y en el desarrollo embrionario (Yagci *et al.*, 2010), así pues, el método de selección de espermatozoides para ICSI es crucial. Elegir el mejor espermatozoide es fundamental de cara a tener éxito en el tratamiento, ya que se reduciría el riesgo de fecundar el mejor ovocito obtenido con un espermatozoide defectuoso, comprometiendo el resultado (De Vos *et al.*, 2003). Las soluciones con PVP aportan el grado de viscosidad necesario para permitir la captura individualizada del espermatozoide, su fácil aspiración evitando que se adhiera a las superficies, pero la selección del gameto masculino la realiza el operador mediante criterios morfológicos y de motilidad. Pero estos criterios que marca la OMS para la identificación de un espermatozoide normal, son muy relativos y limitados (Nagy *et al.*, 1995). Sin embargo, las soluciones que contienen AH permiten la selección de espermatozoides por su estado de madurez. Así pues los espermatozoides que han completado el proceso

madurativo forman un halo característico en el medio, presentan un elevado movimiento flagelar pero no desplazamiento, ya que la cabeza espermática se une fuertemente al AH por los receptores CD44 expuestos en su membrana.

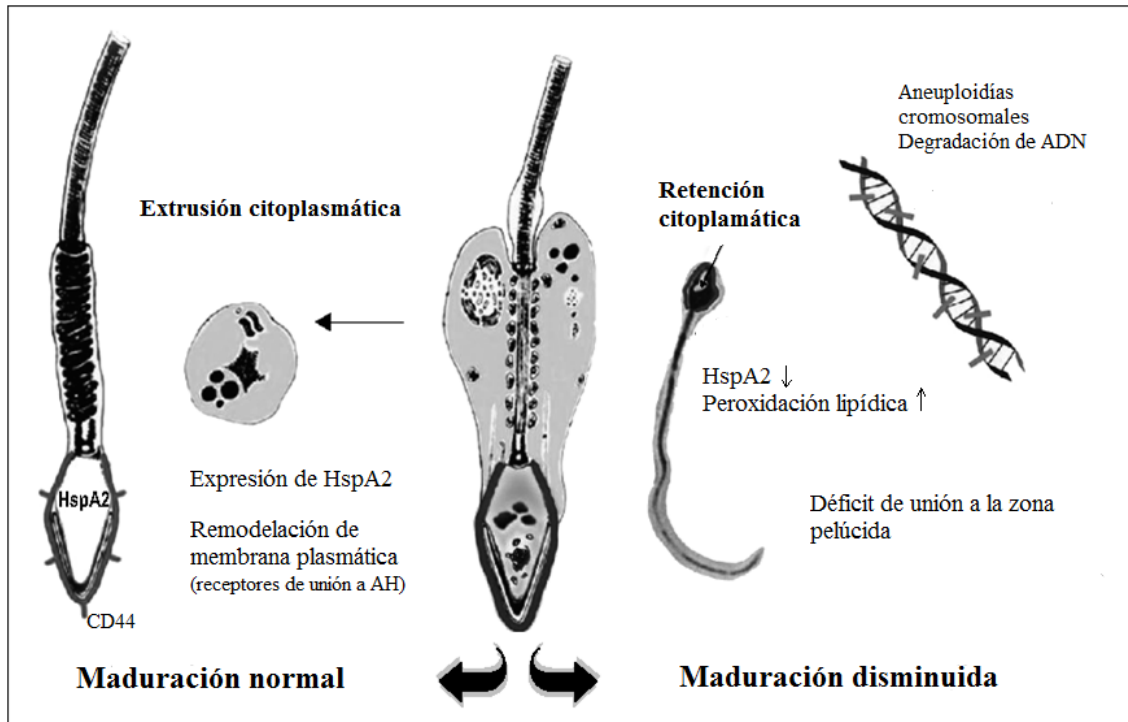


Figura 3: Representación esquemática de los procesos y marcadores bioquímicos acontecidos en la madurez normal y disminuida de los espermatozoides.

Mediante el estudio de distintos marcadores bioquímicos presentes en el espermatozoide humano, se ha comprobado que los espermatozoides inmaduros tienen concentraciones elevadas de creatin kinasa (CK) y otras enzimas citoplasmáticas, aumentada la peroxidación lipídica. Consecuentemente aumentan la fragmentación del ADN, lo que puede dar lugar a espermatozoides anormales morfológicamente (Huszar *et al.*, 2007). Además el espermatozoide con maduración incompleta tienen baja expresión de la proteína chaperona HspA2 provocando, entre otros, que el ADN fragmentado que no pueda ser reparado e interrumpiendo el proceso de transición de histona a protamina nuclear (Huszar *et al.*, 2000b; Carell *et al.*, 2007). El descenso de expresión de HspA2 está asociado con defectos meióticos y aneuploidías cromosómicas (Jakab *et al.*, 2005). Los resultados de numerosos estudios que utilizaron estos

marcadores bioquímicos afianzaron la teoría de la unión a AH únicamente por espermatozoides maduros, que presentan el ADN íntegro (Yagci *et al.*, 2010), y bajas frecuencias de aneuploidías con respecto a los espermatozoides seleccionados en PVP (Jakab *et al.*, 2005; Parmegiani *et al.*, 2010).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los espermatozoides que expresan en su cabeza el receptor de unión al AH (CD44), presentan un estado madurativo final más completo que aquellos espermatozoides que no lo expresan.

La selección espermática para la ICSI a través del AH conlleva una obtención de espermatozoides más euploides que los seleccionados mediante PVP.

Por todo ello, nuestra hipótesis de trabajo es que, con aquellos espermatozoides seleccionados para la ICSI con AH, se obtendrán embriones más euploides que los obtenidos mediante la selección espermática con PVP, y por lo tanto, presentarían una menor tasa de aborto.

El objetivo de este trabajo es discernir entre los resultados obtenidos tras la ICSI de espermatozoides seleccionados con AH y los seleccionados con PVP.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se lleva a cabo en la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). La mayoría de las parejas que realizaron un ciclo de ICSI en el periodo de tiempo que transcurre del 20 de Junio del 2011 hasta el 25 de Mayo del 2012, son incluidas en el estudio. En los Hospitales públicos, las Unidades de Reproducción no admiten a tratamiento a mujeres con 40 años cumplidos. En la población de nuestro estudio existe algún caso con 41 años debido a que estas pacientes tenían menos de 40 años en el momento de iniciar el tratamiento pero a causa de la lista de espera, tenían 41 al realizar un 2º o 3º ciclo de ICSI. La media de edad de las mujeres que participan en el estudio es de 34 años. La calidad seminal (desde individuos normozoospermicos hasta oligoastenoteratozoospermicos) está distribuida equitativamente en los grupos de pacientes generados para el estudio, por lo cual, de afectar a la calidad embrionaria, lo haría de forma aleatoria. Previamente al tratamiento, a ambos miembros de las parejas se les realiza un cariotipo. Sólo los que presentan cariotipo normal son admitidos en el tratamiento.

III.1 Obtención y procesamiento de ovocitos

Las pacientes son tratadas con gonadotropinas recombinantes en la mayoría de los casos, aunque en algún ciclo también se usaron gonadotropinas urinarias ultrapurificadas para inducir una estimulación multifolicular. Se utilizaron dos tipos de estimulación ovárica: protocolo corto y protocolo largo. Los protocolos largos se realizan con agonistas de la GnRH y se inician en la fase lútea media del ciclo previo a la estimulación, concretamente en el día 21. En los protocolos con antagonistas, el análogo se incorpora el 6º día de haber iniciado el estímulo y las pacientes tomaron anticonceptivos en el ciclo previo. Las pautas y dosis de estimulación son personalizadas a cada paciente. Al final del tratamiento se les induce la ovulación con la administración de hCG recombinante, exceptuando los casos en que la paciente tuviera riesgo de síndrome de hiperestimulación y el protocolo de estímulo llevara antagonista, se utilizaron agonistas de la GnRH para desencadenar la misma.

Se les realiza punción folicular transvaginal, 36 horas después de la inducción de la ovulación. Se lleva a cabo en el quirófano de FIV, bajo sedación anestésica de la

paciente y con ecografía vaginal. El líquido folicular extraído es analizado bajo la lupa, en campana de flujo laminar con superficie calefactada para la captación de los ovocitos, que se encuentran rodeados de células del cúmulo y de la granulosa. Los ovocitos obtenidos por paciente son lavados en medio de cultivo tamponado con hepes, (Gamete; COOK[®]) e incubados durante 3 horas a 37°C y bajo una atmósfera al 6 % de CO₂. Posteriormente se les retiran las células del cúmulo y de la corona mediante digestión enzimática con hialuronidasa y ayudados con aspiración mecánica de pipetas Flexipet[®] de COOK[®]. Una vez desnudados los ovocitos, se evalúa el estado madurativo que presentan. Sólo los ovocitos que han completado su maduración y que por lo tanto se encuentran en metafase II (MII) presentando el primer corpúsculo polar, serán utilizados para realizar la ICSI. Éstos ovocitos son lavados e incubados de nuevo con medio IVF (COOK[®]) a 37°C al 6 % de CO₂, durante 30 minutos aproximadamente hasta la realización de la ICSI.

III.2 Obtención y procesamiento de espermatozoides

Las muestras de semen se obtienen mediante masturbación después de 2-3 días de abstinencia del paciente. Estas muestras son recogidas y procesadas en el laboratorio de andrología del HUCA. Se esperan aproximadamente unos 30 minutos antes de realizar cualquier procedimiento con las muestras, para que éstas licuen. Si éste procedimiento no surte efecto, se aspira el semen mecánicamente con pipetas Pasteur. Una vez licuadas las muestras seminales, se mide el volumen de eyaculado y se toman 5 µl para comprobar la concentración y motilidad espermática inicial, con una cámara de Makler. Después se procede al lavado del eyaculado con medio tamponado Gamete (COOK[®]) y se centrifugan a 1800 rpm durante 5-10 minutos.

Posteriormente se realiza swim-up, técnica consistente en añadir sobre el pellet de espermatozoides lavados 1 ml de medio Gamete, sin alterar el pellet, de modo que los espermatozoides con motilidad progresiva se desplacen hacia la superficie. Se inclinan los tubos para que la superficie de contacto sea mayor, y se deja transcurrir aproximadamente una hora antes de recoger el sobrenadante que contiene los espermatozoides móviles. Se vuelven a lavar y se realiza la valoración final de la concentración y motilidad seminal. Para ello se utilizan parámetros estándar de la OMS (World Health Organization, 2010). Con la cámara de Makler se calcula la

concentración y la motilidad progresiva de la muestra seminal, que son la suma de los grados A (progresión rápida) y B (progresión lenta) de motilidad.

III.3 ICSI con PVP frente a ICSI con AH

Aproximadamente cuatro horas después de la punción folicular, se realiza la ICSI a los ovocitos. Previamente se preparan las placas con Gamete para los ovocitos y con PVP o solución de AH que contenga los espermatozoides. En la ICSI convencional con PVP, los espermatozoides se depositan en gotas de PVP que disminuyen su motilidad y permiten su manejo y captura. La selección de los espermatozoides a inyectar en los ovocitos, se lleva a cabo mediante parámetros morfológicos y de motilidad.

En la ICSI con solución de AH, los espermatozoides se seleccionan en base a su habilidad para unirse al AH. Una gota de 2 μ l con suspensión de espermatozoides, se unirá mediante el uso de una pipeta con otra gota de 5 μ l de medio que contiene AH (SpermSlowTM; Origio) y después se incubará unos minutos a 37°C bajo aceite. Los espermatozoides que han completado su estado madurativo se unen fuertemente al AH gracias a los receptores CD44 que presentan en la cabeza, formando un halo característico en la zona de unión de las dos gotas fácil de identificar. Se diferencian de los no móviles o de los inmaduros (que no se unen al AH) en que no se desplazan pero presentan movimiento flagelar. Los espermatozoides unidos al AH son fácilmente separados con la pipeta de inyección y posteriormente son inyectados en los ovocitos.

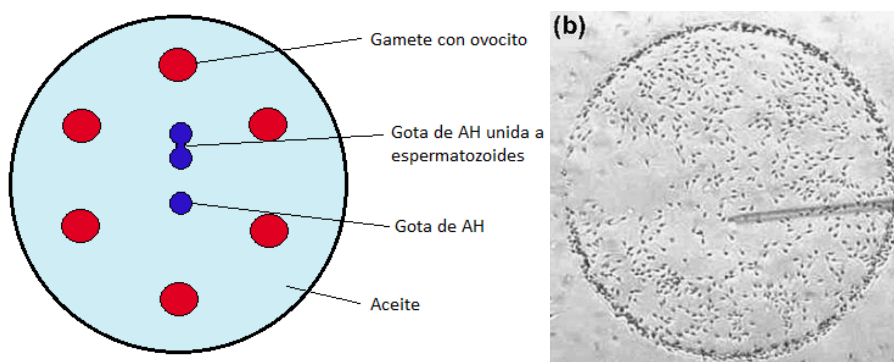


Figura 4: Representación de la placa ICSI con AH. (b) Los espermatozoides unidos al AH permanecen en el centro de la gota, los que no presenta receptor CD44 de unión al AH van a la periferia (Jacab et al., 2005).

Después de inyectar los espermatozoides en los ovocitos, éstos se depositan en una placa de cultivo en medio Cleavage (COOK[®]), y se introducen en el incubador a 37°C con el 6% de CO₂.

III.4 Valoración de la fertilización y la calidad embrionaria

La presencia de los dos pronúcleos y dos corpúsculos polares, de los ovocitos fertilizados, se observa en el microscopio invertido 17-20 horas después de la ICSI. Los cigotos son incubados en medio Cleavage hasta su transferencia.

El desarrollo y la calidad embrionaria se valoran en día +2 y día +3, según criterios morfológicos y cinéticos indicados por ASEBIR como son: el número, contorno, nucleación e igualdad de las blastomeras; la compactación celular, el ritmo de división, el porcentaje y tipo de fragmentación, presencia de vacuolas, de anillo acitoplasmático, de moteado y el tipo de ZP. Se sigue un sistema de gradación para clasificar los embriones, desde la categoría A a la D. El grado A se asigna al embrión con óptima calidad y máxima capacidad implantatoria y el D a los que menos.



Figura 5: *Embriones de categorías A, B, C y D.*

III.5 Transferencia embrionaria

Las transferencias se realizan en día +2 o día +3, dependiendo del número y calidad de los embriones por paciente. En lo que respecta al número de embriones que son transferidos, la ley vigente 14/2006 permite hasta un máximo de 3, pero en este estudio se transfirieron generalmente 2 embriones por paciente, con el acuerdo de la pareja. Sólo en casos seleccionados en los que el riesgo de embarazo triple era bajo, se

transfirieron 3 embriones. Las transferencias de 1 único embrión, se produjeron sólo cuando no se disponía de más embriones o si la pareja no aceptaba el riesgo de un embarazo doble.

Después de la transferencia se trata a la paciente con progesterona para el soporte de la fase lútea.

III.6 Diagnóstico del embarazo y aborto

A los 15 días de la transferencia embrionaria, se determina el diagnóstico del embarazo bioquímico, midiendo la concentración de B-hCG en la primera orina de la mañana (mediante un kit comercial). Este embarazo es posteriormente corroborado en el HUCA mediante la presencia de una ecografía de un saco embrionario con latido fetal positivo.

La ausencia de esta latido fetal tras la ecografía positiva, constaría la presencia de un aborto.

III.7 Estudios

De Junio hasta diciembre de 2011, se comenzó a utilizar el AH como agente selector de espermatozoides. En este periodo de tiempo se llevo a cabo un abordaje inicial del estudio, en el que participaron 165 parejas que asistían a ciclos de ICSI. A 67 pacientes se les realizó ICSI convencional con PVP, de los que se obtuvieron 162 embriones. Y a 98 pacientes se les aplicó la selección espermática por AH antes de realizar ICSI, en los que se obtuvieron 223 embriones. En este primer abordaje se comprobó la calidad embrionaria, así como la tasa de embarazo y aborto.

A partir del 9 de Enero del 2012, se comenzó a utilizar ambos métodos de selección espermática para la ICSI en cada paciente. De modo que a los ovocitos de una misma cohorte se les inyectan espermatozoides tratados con PVP y con AH. Cabe destacar que no todas las parejas que realizaban un ciclo de ICSI pudieron entrar en este estudio, ya que se excluyeron las pacientes que presentaban bajo número de ovocitos (menos de 4). En ellas se utilizó ICSI con PVP para no arriesgar la fertilización de los ovocitos con la nueva técnica, ya que la tasa de fertilización con AH era mucho menor debido a una mayor tasa de degeneración ovocitaria por poca dificultada de la técnica de

ICSI. Para este segundo abordaje del estudio solo se comprueba la tasa de embarazo y de aborto.

Como el potencial implantatorio es mucho mayor en embriones de calidad A y B que los embriones C o D, desestimamos en el estudio las transferencias de embriones C y D. Las transferencias, generalmente de dos embriones, se basan en la categoría embrionaria independientemente del tipo de técnica utilizada, ya que por una cuestión ética prima la obtención de una mayor tasa de implantación en detrimento del estudio. De manera que en este abordaje tenemos 105 pacientes, a las que se le transfieren embriones de categoría A y/o B, provenientes de ICSI con PVP (63 pacientes) o con AH (23 pacientes), y transferencia de embriones provenientes simultáneamente de ambas técnicas (19 pacientes).

Por último, se realiza un estudio de los dos abordajes anteriores de forma conjunta, es decir, todas las transferencias de embriones de buena calidad (A, B) provenientes de ambas técnicas son valorados para la tasa de embarazo y la de aborto. Resultando un total de 244 transferencias de embriones, de las cuales 122 son de PVP, 103 son de AH y 19 de ambos métodos.

III.8 Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en este trabajo se realizó mediante el programa estadístico SPSS (Chicago, Illinois). Para comparaciones de datos con distribución no paramétrica se utilizó el test de chi cuadrado.

Los valores de las variables continuas, son expresados como medias. Los valores de variables categóricas son expresados como porcentajes. Los valores de P menores de 0.05 fueron considerados como indicativos de significación estadística.

IV. RESULTADOS

IV.1 Primer abordaje

En el primer abordaje del estudio participaron 165 pacientes. No se obtuvieron diferencias respecto a la calidad entre los embriones provenientes de PVP y los de AH. Se realizó ICSI con PVP a 67 pacientes y se obtuvieron 162 embriones, con una media de 2,43 (\pm 1,51) por paciente. De estos embriones 79 presentaban calidad A; 52 B; 20 C y 11 categoría D. A los otros 98 pacientes se les realizó la ICSI con AH y se obtuvieron 223 embriones, con una media de 2,28 (\pm 1,29) por paciente. De estos embriones, 99 presentaban categoría A, 67 B, 39 C y 18 D.

Tabla 1: *Calidad embrionaria de ambos métodos en el primer abordaje*

	PVP	AH
Pacientes	67	98
Embriones totales obtenidos	162	223
Embriones tipo A	79 (49%)	99 (44,4%)
Embriones tipo B	52 (32%)	67 (30%)
Embriones tipo C	20 (12,3%)	39 (17,5%)
Embriones tipo D	11 (6,7%)	18 (8,1%)

Se realizaron un total de 139 transferencias embrionarias de buena calidad (embriones A, B), de las que se obtuvieron 41 embarazos, 19 con PVP y 22 con AH. De estos embarazos 4 de PVP abortaron, frente a un único aborto de AH. Pero no se encontraron diferencias al comparar las tasas de embarazo de ambas técnicas (32% PVP frente al 27% de AH). Y las diferencias observadas respecto a la tasa de aborto, 21% con PVP y 4,5% AH, no son significativas.

Tabla 2: *Datos de embarazos y abortos entre ambos métodos en el primer abordaje*

	PVP	AH
Transferencias embrión A y/o B	59	80
Embarazos (tasa)	19 (32%)	22 (27%)
Abortos (tasa)	4 (21%)	1 (4,5%)

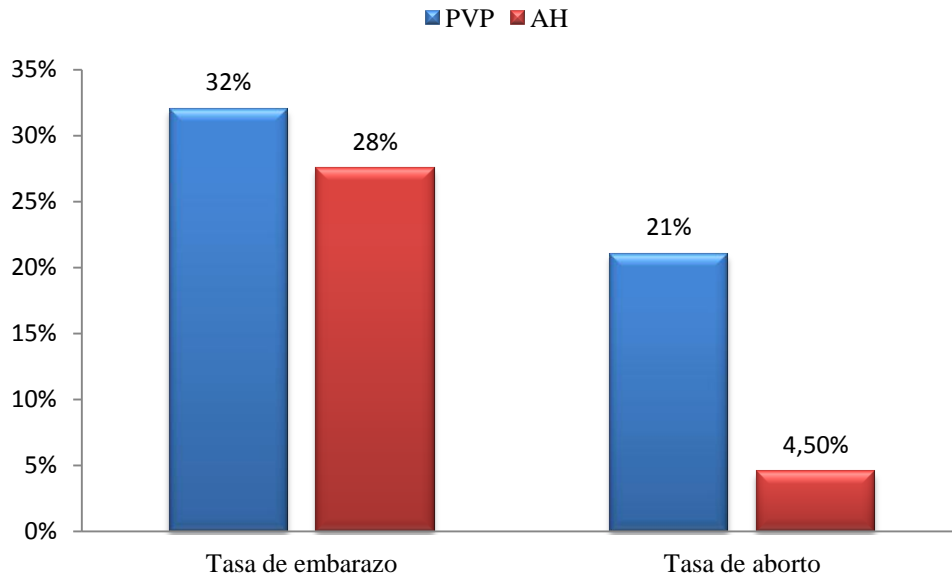


Figura 6: Representación gráfica de la tasa de embarazo y la de aborto entre ambas técnicas en el primer abordaje del estudio.

IV.2 Segundo abordaje

En el segundo abordaje realizado del estudio, la población se divide en tres grupos según la procedencia de los embriones transferidos: de PVP, de AH y de ambas técnicas simultáneamente. Se realizan un total de 105 transferencias embrionarias, de los que se obtienen 19 embarazos con PVP, 8 con AH y 8 con ambos métodos. En este abordaje, tampoco se encuentran diferencias significativas en las tasas de embarazo y aborto entre los tres grupos estudiados.

Tabla 3: Datos del segundo abordaje

	PVP	AH	PVP +AH
Transferencias A y/o B	63	23	19
Embarazos (tasa)	19 (30%)	8 (34,8%)	8 (42%)
Abortos (tasa)	3 (15,8%)	0 (0%)	1 (12,5%)

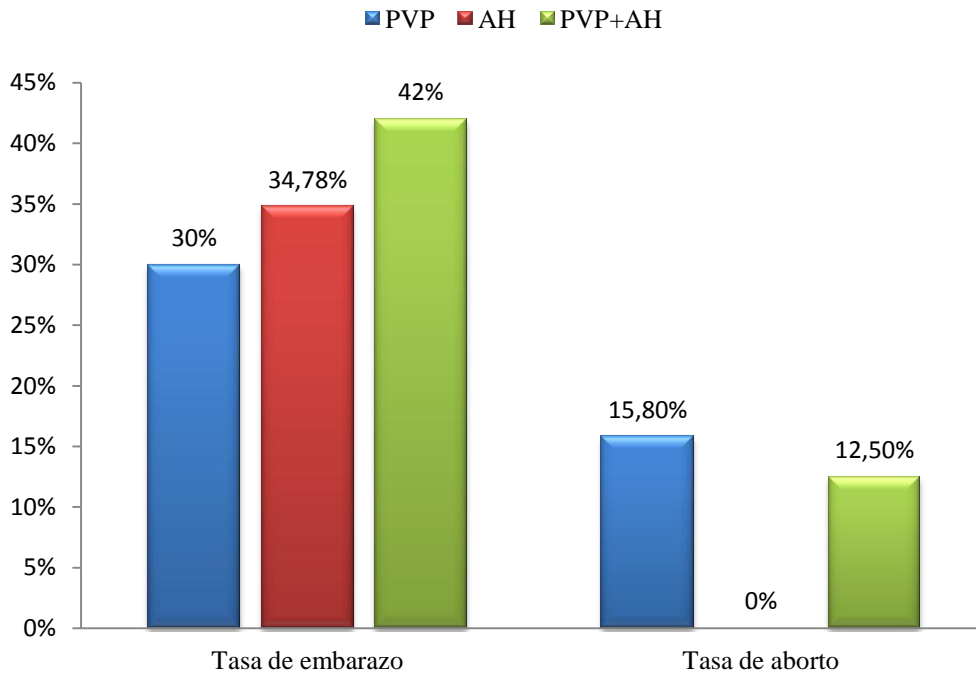


Figura 7: Representación gráfica de las tasas de embarazo y aborto de los tres grupos poblacionales del segundo abordaje del estudio.

IV.3 Estudio conjunto

En el estudio conjunto de ambos abordajes se analizan un total de 244 transferencias de embriones de buena calidad que se dividen según la procedencia de los embriones: 122 de PVP, 103 de AH y 19 de ambos métodos simultáneamente. Los abortos obtenidos fueron 9 en total, 7 de los cuales eran del grupo PVP y solamente uno para cada uno de los otros grupos poblacionales.

Tabla 4: Datos del estudio conjunto de ambos abordajes

	PVP	AH	PVP+AH
Transferencias A y/o B	122	103	19
Embarazos (tasa)	38 (31%)	30 (29%)	8 (42%)
Abortos	7 (18,4%)	1 (3,3%)	1 (12,5%)

No se encuentran diferencias significativas en la tasa de embarazo entre el grupo de PVP (31%), el AH (29%) y el PVP+AH (42%). La tendencia al alza de la tasa de

embarazo en las transferencias realizadas con embriones de las dos técnicas de forma simultánea, se explicaría por una mayor transferencia de embriones A en este grupo respecto a los otros dos ya que el grupo PVP+AH, 17 de las 19 transferencias, llevaban al menos un embrión de categoría A (89,5%). En este estudio se observa que en las transferencias con al menos un embrión A, la tasa de embarazo es significativamente mayor ($p=0.004$) frente al 18,4% de aquellas transferencia que portan los embriones de categoría B.

Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en la tasa de aborto entre las transferencias de embriones provenientes de PVP (18,4%) y las de embriones provenientes de AH (3,3%), ($P < 0.05$).

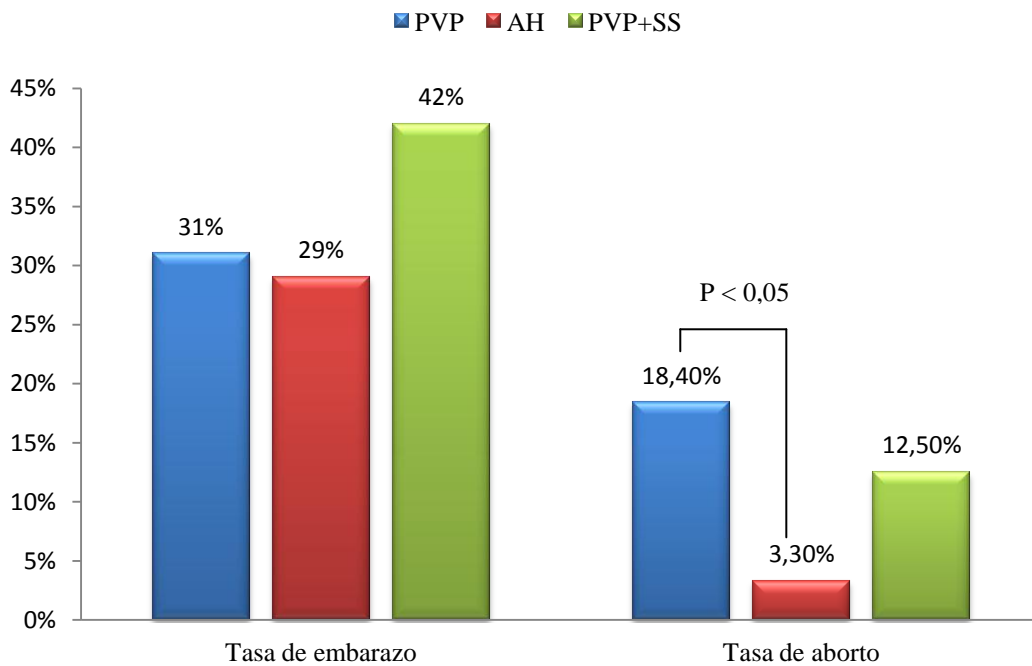


Figura 8: Representación gráfica de la tasa de embarazo y aborto de las transferencias realizadas según el origen embrionario: de la técnica con PVP, con AH y embriones de las dos técnicas simultáneamente (PVP+AH).

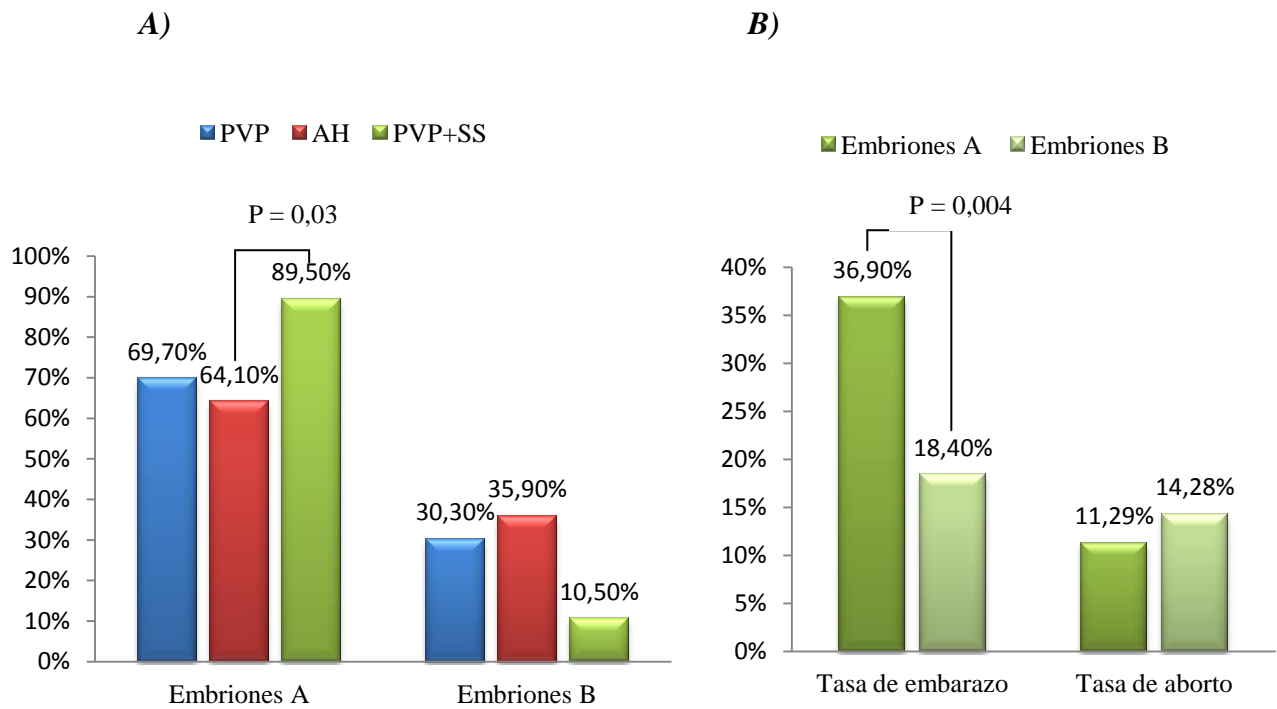


Figura 9: (A) Representación gráfica de la calidad de embriones transferidos (embriones A y B) con relación al tipo de transferencia según la técnica de obtención de dichos embriones. (B) Representación gráfica de las tasas de embarazo y aborto respecto a la calidad embrionaria (embriones A y B).

V. DISCUSIÓN

De las TRA, la aportación más revolucionaria surgió con la ICSI, ya que ésta permitió aumentar las tasas de fertilización, lo que supuso un aumento de la eficiencia y mejoras en los resultados en reproducción asistida. Sin embargo, aún son relativamente bajas las tasas de niños nacidos por TRA (Wright *et al.*, 2008), por este motivo en el campo de la reproducción se buscan constantemente nuevas alternativas.

La selección de un espermatozoide ideal previamente a la realización de la ICSI podría optimizar aún más el rendimiento de ésta técnica. Se ha demostrado que la forma y dimensión de los espermatozoides, cuando se observan con un aumento convencional para ICSI (400X), no son parámetros fiables para la predicción de la integridad de la cromatina ni de la ausencia o presencia de aberraciones cromosómicas numéricas (Celik-Ozenci *et al.*, 2004). De modo, que al realizar la ICSI, se podría seleccionar un espermatozoide con alteraciones comprometiendo los resultados de la técnica. Algunos autores apuntan que la fragmentación en el DNA no se relaciona con peores resultados de FIV/ICSI (Esbert *et al.*, 2011), ni con aneuploidías en el espermatozoide o en el embrión en casos de aborto recurrente (Bronet *et al.*, 2012). Sin embargo son numerosos los que apuntan que el daño en el ADN está relacionado con peores resultados en ICSI incluso aumentando el riesgo de aborto (Zini *et al.*, 2008), así como que los espermatozoides aneuploides son la causa de un aumento en la incidencia de aberraciones en los cromosomas sexuales de la descendencia. Por lo tanto, uno de los puntos críticos para realizar una ICSI, es la selección previa del espermatozoide.

El PVP se utiliza de forma rutinaria en la mayoría de laboratorios de reproducción asistida para reducir la motilidad de los espermatozoides al realizar una ICSI. Este polímero sintético es suficientemente viscoso, permitiendo de manera fácil la inmovilización, captura individual y posterior inyección del espermatozoide en el ovocito. En este caso la selección del espermatozoide la lleva a cabo el operador que realiza la ICSI, por parámetros morfológicos y de motilidad. Sin embargo, la posibilidad de seleccionar un espermatozoide con daños en la cromatina o desordenes cromosómicos, así como la toxicidad del producto ponen de manifiesto el riesgo de utilizar este método. Algunos autores proponen la utilización del AH como sustituto del PVP en este proceso, ya que es una sustancia natural e inocua. Además el AH

selecciona los espermatozoides por su grado de madurez, ya que los que han completado su estado madurativo, presentan unos receptores de unión al AH (CD44) en la cabeza. Los espermatozoides unidos al AH, presentan la cromatina íntegra y menos tasas de aneuploidías cromosómicas que los no unidos.

Por todo ello, llevamos a cabo un estudio para comparar los resultados obtenidos tras realizar ICSI con PVP y con AH. En un primer abordaje con 165 pacientes se analiza la calidad embrionaria obtenida por ambos métodos, así como la tasa de aborto y embarazo de 139 transferencias de embriones de buena calidad. Este primer abordaje, se utilizó de puesta a punto de la técnica así como para el aprendizaje de su manejo. En un segundo abordaje, con 105 pacientes, en el cual, para evitar el sesgo que puedan causar los ovocitos en los resultados, se utilizaron ambas técnicas en una misma cohorte de ovocitos. Y por último se realizó un estudio conjunto, en el que se analizaron 244 transferencias de embriones de buena calidad.

Cabe esperar que las mejoras en la selección de espermatozoides introducidas al utilizar AH para realizar una ICSI, se verán reflejadas en los resultados. Sin embargo, hasta ahora, hay gran controversia y muy poca unanimidad en cuanto a los resultados obtenidos con este método. La mayoría de estudios relacionados con este tema, analizan la fertilización obtenida por ambos métodos. En nuestro caso, no abordamos la fertilización ya que valoramos que los resultados estarían muy sesgados debido a que la técnica con AH necesita una puesta a punto, así como un tiempo de aprendizaje del manejo para el operador. Pero en general los estudios apuntan que no mejora la fertilización con el AH en FIV (Lazarevic *et al.*, 2010; Kovacs *et al.*, 2011) ni en ICSI (Balaban *et al.*, 2003; Parmegiani *et al.*, 2010). Sin embargo, Ye *et al.* (2006) una correlación positiva significativa entre la fertilización y el AH utilizado en FIV clásica, y Nasr-Esfahani y su grupo (2008), obtuvieron tasas de fertilización significativamente más elevada en ICSI con AH.

No obtuvimos diferencias significativas en la tasa de embarazo ni la calidad embrionaria, en consonancia con un estudio sobre 50 parejas con infertilidad masculina obteniendo fertilización significativamente más alta en el grupo AH, pero sin diferencias en las tasas de división y calidad embrionaria, y tampoco en implantación y embarazo clínico (Nasr-Esfahani *et al.*, 2008). Datos similares también se obtuvieron en un estudio realizado con 44 pacientes cuyos ovocitos se fertilizaron aleatoriamente con espermatozoides unidos y no unidos al AH, no presentando diferencias respecto a

fertilización, tasas de transferencia, nº de embriones y calidad de éstos (Van der Bergh *et al.*, 2009). Sin embargo el grupo de Parmegiani (2010) realizó un estudio con 232 pacientes a los que de manera aleatoria se realizó ICSI con PVP e ICSI con AH, obteniendo diferencias significativamente más altas en calidad embrionaria y en el ratio de desarrollo embrionario con AH que con PVP; sin embargo tampoco obtuvieron diferencias en fertilización, embarazo, implantación ni aborto.

A pesar de que no se obtuvieron diferencias significativas en la tasa de embarazo, en el segundo abordaje se observa una tendencia de aumento en los grupos a los que se transfirió al menos un embrión proveniente de ICSI con AH (grupo AH y PVP+AH). Sin embargo en el estudio conjunto de ambos abordajes, no se encuentran diferencias entre el grupo PVP frente al AH, pero se observa una tendencia al alza del grupo AH+PVP, ya que en este grupo se transfirieron más embriones tipo A. Lo cual indica, que los embarazos no están influenciados por el tipo de selección espermática utilizado, si no por la calidad de los embriones transferidos.

Muy pocos estudios abordan la tasa de aborto de ambas técnicas y ninguno de ellos obtiene diferencias significativas. Como se ha mencionado anteriormente, el grupo de Parmegiani (2010) es uno de los que analiza la tasa de aborto. También fue analizada en un estudio en el que a 48 pacientes se les realizó ICSI con AH y a 44 con PVP, no obteniendo diferencias significativas en fertilización, división, calidad embrionaria, embarazo, implantación ni en abortos (Balaban *et al.*, 2003). Algunos estudios realizados sobre el uso AH para FIV clásica tampoco encuentran diferencias significativas con respecto a los abortos (Tarozzi *et al.* 2009). Sólo en un estudio con 240 pacientes se observó una tendencia de disminución de los abortos con el uso de AH (Worriolow *et al.*, 2007). En nuestro caso, en los dos primeros abordajes del estudio se observa una tendencia más baja de abortos en las transferencias con al menos un embrión proveniente de ICSI con AH que al utilizar PVP para seleccionar los espermatozoides. Sin embargo al realizar un estudio conjunto de ambos abordajes, el tamaño muestral aumenta (244 transferencias) y nos permite valorar estadísticamente esa tendencia, siendo nuestro estudio el que destaca por primera vez, que la tasa de aborto es significativamente menor en aquellas transferencias que portan embriones de buena calidad procedentes de la selección espermática con AH.

Entonces, ¿es preferible transferir embriones procedentes de la selección espermática con AH? ¿Es el AH la alternativa buscada a la selección con PVP?

VI. CONCLUSIONES

Del presente trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

1.- No hay diferencias significativas en la calidad de los embriones procedentes de selección espermática con PVP frente a los procedentes de selección espermática con AH.

2.- No se encuentran diferencias significativas en las tasas de embarazo obtenidas entre los dos métodos de selección espermática, si no que la tasa de embarazo está correlacionada con la calidad de los embriones transferidos.

3.- La tasa de aborto es menor en las pacientes a las que se les transfiere al menos un embrión de buena calidad procedente del método de selección espermática con AH.

4.- Por primera vez se describe que la tasa de aborto es significativamente menor cuando se transfieren embriones de buena calidad sólo procedentes de la selección espermática con AH.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Balaban B, Lundin K, Morrell JM, Tjellström H, Urman B, Holmes PV. An alternative to PVP for slowing sperm prior to ICSI. *Hum Reprod* 2003;18:1887-9.

Barak Y, Menezo Y, Veiga A, Elder K. A physiological replacement for polyvinylpyrrolidone (PVP) in assisted reproductive technology. *Hum Fertility* 2001;4:99-103.

Bonet F, Martínez E, Gaytán M, Liñán A, Cernuda D, Ariza M, et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Hum Reprod* 2012,1-18.

Carell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?. *Hum. Reprod. Update* 2007;13:313-327.

Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, et al. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2003;7:462-468.

Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 2004;19:1052-9.

Cohen J, Malter H, Wright G, Mitchell D. Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. *Hum Reprod* 1989;4:435

De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 1993;30:32-44.

De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003;79:42-48.

Dozortesev D, De Sutter P, Rybouchkin A, Dhont M. Oocyte activation and ICSI. *Assist Reprod Rev* 1995;5:32-39.

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Hartl J, Tews G. Laser assisted immobilization of spermatozoa prior to intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod* 2001;16:2628-2631.

Ebner T, Moser M, Yaman C, Sommergruber M, Tews G. Successful birth after laser assisted immobilization of spermatozoa before intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2002;78:417-418.

Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, et al. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod Biomed Online* 2001;23:704-10.

Fishel S, Antinori S, Jackson P, Johnson J, Rinaldi L. Presentation of six pregnancies established by sub-zonal insemination (SUZI). *Hum Reprod* 1991;6:124-30.

Hanson FM, Rock J. Artificial insemination with husband's sperm. *Fertil Steril* 1951;2:162-174.

Hlinka D, Herman M, Vesela J. A modified method of intracytoplasmic sperm injection without the use of polyvinylpyrrolidone. *Hum Reprod* 1998;13:1922-7.

Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Celik-Ozenci C, Cayli S, Delpiano E, et al. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007;14:650-663.

Huszar G, Kovanci E, Moretti E. Selection of individual sperm with low levels of DNA breaks and chromosomal aneuploidies. *Andrology in 2000s*, 6th edn, pp.147-154. Abstracts and miniposters from A journey from Gamete to Newborn, Modern ART and Andrology in the 2000s, 20-23 September 2000a, Leuven, Belgium.

Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;79:1616-24.

Huszar G, Stone K, Diz D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* 2000b;60: 925-932.

Huszar G, Willetts M, Corrales M. Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil Steril* 1990;56:1127-34.

Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84:1665-73.

Jean M, Barriere P, Mirallie S. Intracytoplasmic sperm injection without polyvinylpyrrolidone: an essential precaution? *Hum Reprod* 1996;11:2332.

Jean M, Mirallie S, Bourdineau M, Tatin C, Barriere P. Intracytoplasmic sperm injection with polybinylypyrrolidone: a potential risk. *Fertil Steryl* 2001;76:419-420.

Kanayama K, Sankai T, Nariai K, Endo T, Sakuma Y. simplification of superovulation induction by using polyvinylpyrrolidone as a solvent for FSH in rabbits. *J Veter Med Sci* 1994;56:599-600.

Kepes J, Chen WY, Jim YF. Mucoïd dissolution of bones and multiple pathologic fractures in a patient with past history of intravenous administration of polyvinylpyrrolidone (PVP). A case report. *Bone Mineral*. 1993;22:33-41.

Kovacs P, Kovacs T, Sajgo A, Szollosi J, Matyas S, Kaali SG. The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:49-54.

Lazarevic J, Wikarczuk M, Somkuti SG, Barmat LI, Schinfeld JS, Smith SE. Hyaluronan binding assay (HBA) vs. sperm penetration assay (SPA): can HBA replace the SPA test in male partner screening before in vitro fertilization? *J Exp Clin Assist Reprod* 2010;7:2

Mizuno K, Hoshi K, Huang T. Fertilization and embryo development in a mouse ICSI model using human and mouse sperm after immobilization in polyvinlypyrrolidone. *Hum Reprod* 2002;17:2350-5.

Montag M, Rink K, Delacretaz G, Van der Ven H. Laser induced immobilization and plasma membrane permeabilization in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:846-852.

Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995;10:1123-9.

Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalae M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:197-203.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992;17:340

Parmegiani L, Cognini GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. "Physiologic ICSI": Hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 2010;93:598-604.

Petersen CG, Massaro FC, Mauri AL, Oliveira JBA, Baruffi RLR, Franco JG. Efficacy of hyaluronic acid binding assay in selecting motile spermatozoa with normal morphology at high magnification. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:149.

Ray BD, Howell RT, McDermott A, Hull MGR. Testing the mutagenic potential of polyvinylpyrrolidone and methyl cellulose by sister chromatid exchange analysis prior to use in intracytoplasmic sperm injection procedures. *Hum Reprod* 1995;10: 436-438.

Stephens RC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:336.

Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, Capitani S, Collodel G, De Santo M, et al. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (*Notulae seminologicae* 13). *Hum. Reprod* 1998;13:120-3.

Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D, Serrao L, Fava L, Scaravelli G, et al. Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online* 2009;19:35-43.

Titterington JL, Robinson J, Killick SR, Hay DM. Synthetic and biological macromolecules: protection of mouse embryos during cryopreservation by vitrification. *Hum Reprod* 1995;10:649-653.

Van der Bergh M, Fahy-Deshe M, Hohl MK. Pronuclear zygote score following intracytoplasmic injection of hyaluronan-bound spermatozoa: prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2009;19:796-801.

Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Van Assche E, Devroey P. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 1993;8:1055

Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staesson C, Smits J. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;8:1061-1066.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. *Cambridge University Press, Cambridge*. 1999, 1-20.

Worrilow KC, Huynh T, Bower JB, Anderson AR, Schillings W, Crain JL. PICSI vs. ICSI: statistically significant improvement in clinical outcomes in 240 in vitro fertilization (IVF) patients. *Fertil Steril* 2007;88(Supp1):s37.

Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M. Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2005. *MMWR Surveill Summ* 2008;57:1-23.

Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl* 2010;31:566-572.

Zini A, Boman JM, Belice E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;23:2663-2668.

Ye H, Huang G, Gao Y, Liu DY. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 2006;21:1545-1550.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, De Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 2009;92:1520-4.