

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Eva Rodríguez Acevedo

Maduración espermática y PICSI - Resultados en FIV

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN

TRABAJO FIN DE MÁSTER
Año académico: 2015 - 2016

Supervisor: Vicente Badajoz Liébana
Junio 2016



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Año académico 2015 - 2016

EVA RODRÍGUEZ ACEVEDO

Maduración espermática y PICSI - Resultados en FIV

Supervisor: Vicente Badajoz Liébana
Junio 2016

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar si la selección de espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico permite mejorar los resultados de ICSI en pacientes con un nivel de inmadurez espermática superior al 15% y con parámetros seminales sub-óptimos.

MÉTODO: Los sujetos de este estudio fueron 36 parejas, con un nivel de inmadurez espermática superior al 15% y con parámetros seminales sub-óptimos, que realizaron un ciclo de ICSI y un posterior ciclo de PICS. Se formaron dos grupos (grupo ICSI y grupo PICS) y se comparó la tasa de fecundación y la tasa de embarazo clínico entre ambos. El grupo de ICSI incluyó los ciclos de ICSI de las 36 parejas y el grupo de PICS los ciclos de PICS de esas mismas 36 parejas (realizados con posterioridad a los de ICSI). Se utilizó el programa SPSS para realizar los cálculos estadísticos.

RESULTADOS: Se observó un aumento estadísticamente significativo en la tasa de fecundación en el grupo de PICS con respecto al de ICSI (64.7% vs 53.6%, $P=0.013$), pero no en la tasa de embarazo clínico (18.5% vs 11.84%, $P=0.271$).

CONCLUSIÓN: Los resultados obtenidos podrían estar indicando que la técnica PICS resulta beneficiosa en pacientes con un nivel de inmadurez espermática superior al 15% y con parámetros seminales sub-óptimos.

Palabras clave: ICSI, PICS, ICSI fisiológica, ácido hialurónico, microinyección intracitoplasmática de espermatozoide, selección espermática.

AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes de la clínica GINEFIV por ayudarme en todo lo relativo a las prácticas y al Trabajo Fin de Máster.

ÍNDICE

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	5
3 MATERIALES Y METODOLOGÍAS	7
3.1 Diseño experimental	7
3.2 Preparación de las muestras de semen.....	7
3.3 Selección de ovocitos e ICSI	8
3.4 Análisis estadísticos	9
4 RESULTADOS.....	11
5 DISCUSIÓN	13
6 CONCLUSIONES	15
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

LISTA DE TABLAS

Tabla 4-1 Comparación de los resultados entre los grupos de ICSI y de PICSI.....	11
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

2pn	2 pronúcleos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CCO	Complejo cúmulo-ovocito
hCG	Gonadotropina coriónica humana
ICSI	Microinyección intracitoplasmática de espermatozoide
MII	Metafase II
PICSI	ICSI fisiológica
PVP	Polivinilpirrolidona

1 INTRODUCCIÓN

Para que tenga lugar la fecundación *in vivo*, los espermatozoides deben superar ciertas barreras naturales. En el tracto genital femenino, los ovocitos se encuentran rodeados de ácido hialurónico (componente principal de la matriz del *cumulus oophorus* que rodea el ovocito), el cual interviene en el mecanismo de selección espermática. Solamente los espermatozoides maduros que han expresado receptores específicos que les permiten unirse y digerir el ácido hialurónico son capaces de fecundar el ovocito (Parmegiani *et al.*, 2010).

Con la ICSI (o microinyección intracitoplasmática de espermatozoide) se evaden todas las barreras naturales. La tasa de fecundación conseguida con esta técnica se ve afectada, en gran medida, por la calidad del semen utilizado para la inseminación (De Vos *et al.*, 2003; Nagvenkar *et al.*, 2005). Existen estudios que han asociado una mayor incidencia de aberraciones cromosómicas numéricas (Simpson y Lamb, 2001), aberraciones cromosómicas estructurales citogenéticas detectables (Bonduelle *et al.*, 2002), aneuploidías cromosómicas (Van Steirteghem *et al.*, 2002) y disomías en los cromosomas sexuales (Palermo *et al.*, 2000) en los embriones resultantes de ICSI. En la ICSI, los espermatozoides son seleccionados de acuerdo a su morfología y motilidad y esto no asegura que estos espermatozoides estén libres de anomalías cromosómicas o daños en el ADN (Bartoov *et al.*, 2001; Bartoov *et al.*, 2002; Celik-Ozenci *et al.*, 2004; Nasr-Esfahani *et al.*, 2008).

Anteriormente se ha explicado que el ácido hialurónico interviene en el mecanismo de selección espermática en el tracto genital femenino. Se ha demostrado que también *in vitro* permite la selección de espermatozoides maduros. Los espermatozoides capaces de unirse al ácido hialurónico *in vitro* son aquellos que han completado la remodelación de la membrana plasmática, la extrusión citoplasmática y la maduración nuclear (Cayli *et al.*, 2003; Huszar *et al.*, 2003; Huszar *et al.*, 2007; Parmegiani *et al.*, 2010). En base a esto, la selección, previa a la ICSI, de espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico mejoraría los resultados.

La ICSI fisiológica o PICSI es la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados por su capacidad de unirse *in vitro* al ácido hialurónico. Este método de selección espermática es altamente específico y presenta un riesgo biológico mínimo en comparación con otros métodos de selección espermática (Huszar *et al.*, 2003; Said y Land, 2011). Se ha demostrado que los productos que contienen ácido hialurónico no tienen efectos negativos sobre el desarrollo del cigoto tras la microinyección y pueden ser metabolizados por el ovocito (Balaban *et al.*, 2003; Barak *et al.*, 2001; Van den Bergh *et al.*, 2009). No se han referido reacciones adversas en cuanto a la fecundación o al desarrollo del embrión después de la utilización de espermatozoides seleccionados por este método en estudios clínicos de fecundación *in vitro* (Huszar *et al.*, 2007). Otra de las ventajas de este método sobre otras técnicas de selección espermática es que se trata de un método fácilmente disponible que no requiere instrumentación costosa (Said y Land, 2011).

Actualmente se comercializan dos sistemas diseñados para la selección de espermatozoides capaces de unirse al ácido hialurónico: una placa de cultivo de poliestireno con micropuntos de hidrogel de ácido hialurónico fijados en la parte interior de la placa (PICSI® Sperm Selection Device, MidAtlantic Diagnostic) o un medio viscoso que contiene ácido hialurónico (Sperm Slow™, MediCult). La placa selectora de espermatozoides PICSI permite seleccionar espermatozoides maduros según su capacidad de unirse al hidrogel de ácido hialurónico. Imita la unión de los espermatozoides maduros al *cumulus oophorus* que rodea al ovocito, un paso selectivo importante en la fecundación natural.

Existen estudios en los que se demuestra que la técnica PICSI permite obtener mejores resultados en comparación con la ICSI convencional (Ménézo y Nicollet, 2004; Nasr-Esfahani *et al.*, 2008; Parmegiani *et al.*, 2010; WorriLOW *et al.*, 2007). Sin embargo, la técnica PICSI resulta más cara y requiere un procedimiento experimental más largo que el de la ICSI convencional. Por esa razón, sería interesante conocer en qué grupos de pacientes resulta beneficiosa la técnica; es decir, en qué casos la PICSI permite mejorar los

resultados de la ICSI convencional. En el trabajo desarrollado por Majumdar y Majumdar (2013) se estudió si la selección de espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico permitía mejorar los resultados en pacientes con parámetros seminales normales sometidos a ciclos de ICSI. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de ICSI y PCSI en cuanto a tasa de fecundación y tasa de embarazo clínico. En el presente estudio se compararán tasa de fecundación y tasa de embarazo clínico entre las técnicas de ICSI y PCSI en un grupo de pacientes con un nivel de inmadurez espermática superior al 15 % y con parámetros seminales sub-óptimos con el fin de dilucidar si la técnica PCSI resulta beneficiosa en este grupo de pacientes.

La selección de espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico permite seleccionar a los espermatozoides que han alcanzado su madurez nuclear y citoplasmática (Huszar *et al.*, 2003; Tarozzi *et al.*, 2009). Por lo tanto, tendría sentido pensar que la PCSI podría mejorar los resultados de la ICSI en casos de inmadurez espermática superior al 15 %. En un estudio llevado a cabo por Worilow y colaboradores (2013), se observó un aumento de la tasa de implantación y embarazo clínico, así como una disminución de la tasa de aborto espontáneo, al seleccionar espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico en ciclos de ICSI. Esta mejora de la PCSI con respecto a la ICSI convencional fue observada por Worilow y colaboradores solamente en aquellos casos en los que la capacidad de los espermatozoides de unirse a ácido hialurónico era baja, y por lo tanto la inmadurez de la muestra espermática era alta.

También es esperable que la PCSI permita mejorar los resultados en pacientes con parámetros seminales sub-óptimos sometidos a ciclos de ICSI, ya que esto ya ha sido demostrado en varios estudios (Menezo *et al.*, 2010; Nasr-Esfahani *et al.*, 2008; Parmegiani *et al.*, 2010; Van Den Bergh *et al.*, 2009).

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es comprobar si la técnica PCSI resulta beneficiosa en pacientes con un nivel de inmadurez espermática superior al 15% y con parámetros seminales sub-óptimos.

3 MATERIALES Y METODOLOGÍAS

3.1 Diseño experimental

Los datos incluidos en este estudio se obtuvieron a partir de pacientes que acudieron a la Clínica de Reproducción Asistida Ginefiv (Madrid, España) por problemas de infertilidad. Los sujetos de este estudio fueron 36 parejas que realizaron un ciclo de ICSI y un posterior ciclo de PICSÍ. Estos pacientes presentaban resultados de fragmentación del ADN espermático que iban desde 4.54% hasta 35.13% y un nivel de inmadurez espermática superior al 15%.

Se hicieron dos grupos (grupo ICSI y grupo PICSÍ) con el fin de comparar tasa de fecundación y tasa de embarazo clínico entre ellos. El grupo de ICSI incluyó los ciclos de ICSI de las 36 parejas y el grupo de PICSÍ los ciclos de PICSÍ de esas mismas 36 parejas (realizados con posterioridad a los de ICSI). Al estar formados los dos grupos por los mismos pacientes se elimina la variabilidad entre grupos, de manera que este diseño experimental permite conocer si realmente las diferencias existentes entre resultados de ICSI y PICSÍ son debidas a la técnica en sí y no a la variabilidad existente entre parejas de ambos grupos.

3.2 Preparación de las muestras de semen

Las muestras de semen de las 36 parejas fueron obtenidas mediante masturbación tras 2-4 días de abstinencia sexual. Una vez licuadas, las muestras de semen fueron procesadas. Siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 1999) se determinó la motilidad y concentración espermática. La morfología espermática se determinó de acuerdo a los criterios de Kruger (Kruger *et al.*, 1986).

El semen licuado se depositó en un tubo cónico de 10 mL que contenía 0.5 mL de un gradiente de 40 % de SpermGrad sobre 0.5 mL de un gradiente de 80% de SpermGrad (Vitrolife, Gothernburg, Suecia). Tras centrifugación a 2 G durante 20 minutos, se recogió el pellet y se lavó, en otro tubo cónico, con G-IVF (Vitrolife, Gothernburg, Suecia) centrifugándolo a 3 G durante 5 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se añadió medio final (G-IVF) con

cuidado de no resuspender el sedimento. Las muestras de semen se mantuvieron en el incubador a 37°C hasta su uso para permitir el *swim-up* de los espermatozoides móviles progresivos.

Las muestras de semen con fragmentación del ADN espermático superior al 27% se sometieron, una vez capacitadas, al sistema MACS ART Annexin V (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), sistema diseñado para la depleción *in vitro* de los espermatozoides apoptóticos humanos mediante depleción de las células positivas a la fosfatidilserina en muestras de semen. Para ello, se siguió el protocolo indicado por la casa comercial.

3.3 Selección de ovocitos e ICSI

Los ovocitos fueron recogidos mediante punción folicular transvaginal ecoguiada a las 34-36 horas post hCG. Tras la aspiración folicular, el líquido folicular fue examinado y los complejos cúmulo-ovocito (CCO) fueron recogidos, transferidos a medio G-IVF (Vitrolife, Gothenburg, Suecia) y mantenidos en el incubador a 37°C y 6% de CO₂ durante, aproximadamente, 2 horas.

A continuación, los complejos cúmulo-ovocito fueron decumulados química y mecánicamente, usando una flexipet 150 µL (Stripper Tips, Origio, USA) tras unos 20 segundos de exposición a hialuronidasa (Hyase-10X, Vitrolife, Gothenburg, Suecia) en medio G-MOPS PLUS (Vitrolife, Gothenburg, Suecia).

Los ovocitos maduros fueron inyectados con los espermatozoides de acuerdo al protocolo de ICSI del centro. En el caso de los ciclos de ICSI, los espermatozoides fueron seleccionados morfológicamente en una gota de 10 µL de polivinilpirrolidona (PVP, Medicult, Dinamarca) cubierta de aceite. En el caso de los ciclos de PICS, dispositivos selectores de espermatozoides PICS (Origio MidAtlantic Devices, USA) fueron utilizados para la selección de espermatozoides maduros. El dispositivo consistió en una placa de poliestireno con tres micropuntos de hialuronano fijados en la parte inferior interior. Gotas de 10 µL de G-MOPS PLUS (Vitrolife, Gothenburg, Suecia) fueron colocadas sobre los micropuntos, lo que permitió la hidratación e hinchamiento del

hialuronano, y una gota de 10 μ L de PVP fue colocada a la derecha de éstas antes de cubrir la placa con aceite. Se añadieron 1-2 μ L del semen capacitado a cada gota de hialuronano. Tras 5 minutos de incubación a 37°C, se seleccionaron los espermatozoides unidos al hialuronano (los que no presentaban migración progresiva a pesar del movimiento vigoroso de la cola) y con buena morfología, se recogieron con la micropipeta ICSI y se expulsaron en la gota de PVP para procesarlos por el procedimiento ICSI. A continuación, desde la gota de PVP se seleccionaron y cargaron los espermatozoides procesados individuales para su microinyección en los ovocitos según el protocolo de microinyección estándar.

La fecundación fue chequeada a las 16-18 horas después de la microinyección. Los embriones que presentaron dos pronúcleos (2pn) se mantuvieron en cultivo en medio G1-PLUS (Vitrolife, Gothenburg, Suecia) desde el día 1 después de la microinyección hasta el día 3, y en medio G2-PLUS (Vitrolife, Gothenburg, Suecia) desde el día 3 hasta el día 5. Los embriones seleccionados fueron transferidos mediante transferencia ecoguiada.

La tasa de fecundación se calculó como el porcentaje de embriones 2pn respecto al número de ovocitos MII (metafase II) microinyectados. La tasa de embarazo clínico se calculó como el número de embarazos clínicos expresados por 100 ciclos de transferencia de embriones.

3.4 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso del programa SPSS para Windows, versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se utilizó la prueba Chi-cuadrado para comparar la de tasa de fecundación y tasa de embarazo clínico entre los ciclos de PICSÍ y los de ICSI. Un p-valor menor de 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

4 RESULTADOS

Un total de 36 casos fueron analizados en el grupo ICSI y los mismos 36 casos en el de PICSÍ. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de embarazo clínico en el grupo de PICSÍ con respecto al de ICSI (18.5% vs 11.84%, $P=0.271$). Sin embargo, sí se observó un aumento estadísticamente significativo en la tasa de fecundación en el grupo de PICSÍ con respecto al de ICSI (64.7% vs 53.6%, $P=0.013$) (ver Tabla 4-1).

Tabla 4-1 Comparación de los resultados entre los grupos de ICSI y de PICSÍ

	Grupo ICSI	%	Grupo PICSÍ	%	<i>p</i> -valor
Tasa de fecundación	134/250	53.6	163/252	64.7	0.013*
Tasa de embarazo clínico	9/76	11.84	12/65	18.5	0.271

Un *p*-valor menor de 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

* *p*-valor < 0.05

5 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la técnica PICSI permite obtener mejores tasas de fecundación en comparación con la ICSI convencional en pacientes con un nivel de inmadurez espermática superior al 15% y con parámetros seminales sub-óptimos. Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía.

Existen estudios en los que se demuestra que la selección de espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico permite mejorar las tasas de fecundación en pacientes con parámetros seminales sub-óptimos sometidos a ciclos de ICSI (Menezo *et al.*, 2010; Nasr-Esfahani *et al.*, 2008; Parmegiani *et al.*, 2010; Van Den Bergh *et al.*, 2009).

En un estudio desarrollado por Castillo-Baso y colaboradores (2011), se demostró que la selección de espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico permitía mejorar la calidad embrionaria solamente en casos de teratozoospermia. En los casos en los que no existía teratozoospermia no se observó beneficio de la técnica PICSI sobre la ICSI convencional.

Worrilow y colaboradores (2013) observaron un aumento de la tasa de implantación y embarazo clínico, así como una disminución de la tasa de aborto espontáneo, al seleccionar espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico en ciclos de ICSI. Solamente se observó esta mejora de la PICSI con respecto a la ICSI convencional en aquellos casos en los que la capacidad de los espermatozoides de unirse a ácido hialurónico era baja. Varios autores han defendido que existe relación entre la capacidad de los espermatozoides de unirse a ácido hialurónico *in vitro* y la madurez espermática. Los espermatozoides capaces de unirse *in vitro* a ácido hialurónico son aquellos que han alcanzado su madurez nuclear y citoplasmática (Cayli *et al.*, 2003; Huszar *et al.*, 2003; Huszar *et al.*, 2007; Parmegiani *et al.*, 2010; Tarozzi *et al.*, 2009). Por lo tanto, se podría decir que Worriow y colaboradores (2013) observaron en su estudio que el aumento de la tasa de implantación y embarazo clínico, así como la disminución de la tasa de aborto espontáneo, al seleccionar espermatozoides capaces de unirse *in*

vitro al ácido hialurónico en ciclos de ICSI, se daba solamente en aquellos casos en los que la inmadurez de la muestra espermática era alta.

En base a los resultados del estudio de Castillo-Baso y colaboradores (2011) y a los resultados de WorriLOW y colaboradores (2013), se podría afirmar que la técnica PICSi resulta beneficiosa solamente en determinados grupos de pacientes. Los resultados obtenidos en el presente estudio podrían estar indicando que uno de los grupos en los que la técnica PICSi resulta beneficiosa es en el caso de pacientes con un nivel de inmadurez espermática superior al 15 % y con parámetros seminales sub-óptimos.

En cuanto a los resultados obtenidos de tasa de embarazo clínico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de ICSI y PICSi en pacientes con un nivel de inmadurez espermática superior al 15% y con parámetros seminales sub-óptimos (ver Tabla 4-1). Estos resultados se contradicen con los obtenidos por WorriLOW y colaboradores (2013), quienes observaron un aumento en la tasa de embarazo clínico al seleccionar espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico en ciclos de ICSI en pacientes que presentaban baja capacidad de unión espermática a ácido hialurónico, y por lo tanto alta inmadurez espermática.

El no haber obtenido, en el presente trabajo, resultados que indiquen que la técnica PICSi permite obtener mejores tasas de embarazo clínico en comparación con la ICSI convencional en pacientes con un nivel de inmadurez espermática superior al 15% y con parámetros seminales sub-óptimos, podría ser debido, en parte, al hecho de que la edad media de la población estudiada fuese mayor de 35 años, lo cual se asocia con un mayor riesgo de fallo de implantación (Kroon *et al.*, 2011).

6 CONCLUSIONES

1. La selección de espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico permite mejorar la tasa de fecundación en pacientes con un nivel de inmadurez espermática superior al 15% y con parámetros seminales sub-óptimos sometidos a ciclos de ICSI. Esto podría estar indicando que la técnica PICSI resulta beneficiosa en este grupo de pacientes.
2. No se dispone de evidencias suficientes para afirmar que la selección de espermatozoides capaces de unirse *in vitro* al ácido hialurónico permite mejorar la tasa de embarazo clínico en pacientes con un nivel de inmadurez espermática superior al 15% y con parámetros seminales sub-óptimos sometidos a ciclos de ICSI.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, (2003). Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*.79, 42–48.
- Balaban B, Lundin K, Morrell JM, Tjellström H, Urman B, Holmes PV, (2003). An alternative to PVP for slowing sperm prior to ICSI. *Hum Reprod*. 18, 1887–1889.
- Barak Y, Menezo Y, Veiga A, Elder K, (2001). A physiological replacement for polyvinylpyrrolidone (PVP) in assisted reproductive technology. *Hum Fertil* 4, 99–103.
- Bartoov B, Berovitz A, Eltes F, (2001). Selection of sperm with normal nuclei to improve pregnancy rates with ICSI. *N Engl J Med*. 345, 1067–1068.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y, (2002). Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl*. 23, 1–8.
- Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I, (2002). Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 17, 2600–2614.
- Castillo-Baso J, Garcia-Villafaña G, Santos-Haliscak R, Diaz P, Sepluvelda-Gonzalez J, Hernandez-Ayup S, (2011). Embryo quality and reproductive outcomes of spermatozoa selected by physiologic-icsi or conventional icsi in patients with kruger <4% and >4% normomorphology. *Fertil Steril* 96, S159.
- Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G, (2003). Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online*. 7, 462–468.
- Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G, (2004). Sperm selection based on shape

- properties alone does not preclude the presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod.* 19, 2052–2059.
- Huszar G, Celik-Ozenci C, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L, (2003). Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril.* 79 Suppl 3, 1616–1624.
 - Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Celik-Ozenci C, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S, (2007). Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online.* 14, 650–663.
 - Kroon B, Harrison K, Martin N, Wong B, Yazdani A, (2011). Miscarriage karyotype and its relationship with maternal body mass index, age, and mode of conception. *Fertil Steril* 95, 1827-1829.
 - Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K, (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 46, 1118–1123.
 - Majumdar G, Majumdar Abha, (2013). A prospective randomized study to evaluate the effect of hyaluronic acid sperm selection on the intracytoplasmic sperm injection outcome of patients with unexplained infertility having normal semen parameters. *J Assist Reprod Genet* 30, 1471–1475.
 - Menezo Y, Junca AM, Dumont M, De Mouzon J, Cohen-Bacrie P, Ben Khalifa M, (2010). “Physiologic” (hyaluronic acid-carried) ICSI results in the same embryo quality and pregnancy rates as with the use of potentially toxic polyvinylpyrrolidone (PVP). *Fertil Steril* 94, S232.
 - Ménézo Y, Nicollet B, (2004). Replacement of PVP by hyaluronate (SpermSlow™) in ICSI—Impact on outcome. Abstract of 18th World Congress on Fertility and Sterility IFFS.
 - Nagvenkar P, Zaveri K, Hinduja I, (2005). Comparison of the sperm aneuploidy rate in severe oligozoospermic and oligozoospermic men and its relation to intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril.* 84, 925–931.

- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalae M, (2008). Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.* 25, 197–203.
- Palermo GD, Neri QV, Hariprashad JJ, Davis OK, Veeck LL, Rosenwaks Z, (2000). ICSI and its outcome. *Semin Reprod Med* 18, 161–169.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M, (2010). “Physiologic ICSI”: Hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril.* 93(2), 598–604.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M, (2010). Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet.* 27, 13–16.
- Said TM, Land JA, (2011). Effects of advanced selection methods on sperm quality and art outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 17, 719-733.
- Simpson JL, Lamb DJ, (2001). Genetic effects of intracytoplasmic sperm injection. *Semin Reprod Med* 19, 239–249.
- Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D, Serrao L, Fava L, Scaravelli G, Borini A, (2009). Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online* 19 Suppl 3, 35–43.
- Van den Bergh M, Fahy-Deshy M, Hohl MK, (2009). Pronuclear Z-Score is not influenced by the intracytoplasmic injection of Hyaluronan bound spermatozoa: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online.* 19(6), 796-801.
- Van Steirteghem A, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I, (2002). Follow-up of children born after ICSI. *Hum Reprod Update* 8, 111–116.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen–cervical mucus interaction. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999
- Worrilow KC, Eid S, Woodhouse D, Perloe M, Smith S, Witmyer J, Ivani K, Khoury C, Ball GD, Elliot T, Lieberman J, (2013). Use of hyaluronan in

the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): Significant improvement in clinical outcomes—multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 28(2), 306–314.

- Worilow KC, Huynh T, Bower JB, Anderson AR, Schillings W, Crain JL, (2007). PCSI VS ICSI: statistically significant improvement in clinical outcomes in 240 in vitro fertilization (IVF) patients. *Fertil Steril* 88 Supp 1: s37.

