

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



“Evaluación de la tasa de embarazo en pacientes de ovo donación sometidas a técnicas de ICSI convencional y selección espermática por ácido hialurónico”

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

María Alejandra Pérez Padilla

Lima, Perú

2017

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mis padres, porque ellos siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y sus consejos para hacer de mí una mejor persona

A mis hermanos, por sus palabras de compañía, siendo mis verdaderos amigos.

A mis hijos, porque ningún sacrificio es suficiente, y aportan una cuota de alegría y juventud a mi vida

A mi esposo por sus palabras y confianza, por su amor y brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido para el logro de mis objetivos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi casa de estudios, la Universidad Ricardo Palma por haberme permitido ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, y así también a los diferentes docentes que me brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día

Agradezco también a mi Asesor de tesis Mg. Mauricio Gonzales Molfino por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme tenido mucha paciencia para poder guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

Un agradecimiento especial a la Clínica de Fertilidad y Reproducción asistida (CEFRA) por permitirme realizar mi tesis dentro de sus instalaciones, al Dr. Ricardo Pella por el apoyo y la confianza depositada en mí para el manejo de toda la información recibida. Al Blgo. Jhon Troya por ese espíritu de siempre querer investigar y permitirme trabajar en su área de investigación y compartir conmigo muchos momentos gratos.

Y finalmente agradecer a todos mis compañeros de clase, ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo moral han aportado en un alto porcentaje a mis ganas de seguir adelante en mi carrera profesional.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el impacto del procedimiento de selección espermática por ácido hialurónico en los resultados de los ciclos de reproducción con ovocitos de donante.

El estudio retrospectivo se realizó en 187 ciclos del programa de ovodonación del centro de fertilidad y reproducción asistida (CEFRA). Se consideraron 2 grupos: Grupo de ICSI convencional (n =153) y el grupo de selección de espermatozoides de ácido hialurónico (grupo PICSI, n = 34). Se utilizaron muestras de esperma fresco marido en ambos grupos. Después de la selección de espermatozoides, ovocitos donados fueron inyectados. Los ovocitos con 2 pronúcleos se consideran fertilizados y se mantienen cultivados en gotas de 50 ul de medio Global Total (Life Global, USA) cubiertas con aceite mineral (Lite Oil, Life Global, USA) hasta el día 5 para su transferencia. En ambos grupos se midieron los siguientes parámetros: volumen de esperma, concentración y motilidad espermatozoides; edad de la donante, de la receptora, del varón, número de ovocitos inyectados, fertilización, número de transferencia de embriones, y bioquímico y la tasa de embarazo.

Como resultado se observa que la selección con ácido hialurónico en comparación con el ICSI convencional no mejora las tasas de embarazo bioquímico (80.4% y 76.5%, respectivamente) y embarazo clínico (74.5% y 70.58%, respectivamente) en el programa de ovo donación.

En conclusión, la selección de esperma por ácido hialurónico no mejora la tasa de embarazo usando muestra seminal normal en el programa de donación de ovocitos

Palabras claves

Ácido hialurónico, esperma, ICSI, PISCI.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the impact of the Hyaluronic-acid-sperm-selection in the pregnancy rate of an egg-donation program.

This retrospective study was performed in 187 cycles of the egg-donation program in the Center of Fertility and Assisted Reproduction (CEFRA). Two groups were considered: Conventional ICSI group (n =153) and Hyaluronic acid sperm-selection group (physiological ICSI or PICSI group, n= 34). Fresh husband sperm specimens were used in both groups. After sperm selection, donated oocytes were injected. Oocytes with 2 pronuclei were considered as fertilized and were cultured in 50- μ l drops of Global Total Medium (Life Global, USA) with oil overlay (Lite oil, Life global, USA) until the day of transfer (Day 5). The following parameters were assessed for both groups: sperm volume, concentration and motility; patient age, fertilization rate, and biochemical and pregnancy rate.

Sperm selection with hyaluronic-acid in comparison to conventional ICSI does not improve biochemical pregnancy (80.4% and 76.5%, respectively) or clinical pregnancy (74.5% and 70.58%, respectively) in an egg-donation program.

In conclusion, hyaluronic acid sperm-selection does improve the outcome, when using normal sperm samples and donor eggs.

Key words: Hyaluronic acid, sperm, ICSI, PICSI.

.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ÍNDICE.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	10
III. MARCO TEÓRICO	11
3.1 TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.....	11
3.1.1 <i>Inseminación artificial</i>	11
3.1.2 <i>FIV</i>	11
3.1.3 <i>ICSI</i>	12
3.1.4 <i>ICSI con ácido hialurónico</i>	12
3.2 INFERTILIDAD MASCULINA.....	13
3.2.1 <i>Estudio inicial de la infertilidad masculina</i>	13
IV. ANTECEDENTES.....	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 LUGAR DE EJECUCIÓN.....	19
5.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN.	19
5.3 DISEÑOS DE INVESTIGACIÓN	19
5.4 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	19
5.4.1 <i>Grupos de estudio</i>	19
5.4.2 <i>Variables Independientes</i>	20
5.4.3 <i>Variables Dependientes</i>	20
5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
5.5.1 <i>Obtención y procesamiento de la muestra seminal</i>	21
5.5.2 <i>Obtención y procesamiento de oocitos</i>	22

5.5.3 Microinyección de oocitos.....	23
5.5.4 Valoración de la fecundación y calidad embrionaria	24
5.5.5 Transferencia embrionaria.....	25
5.5.6 Diagnóstico de embarazo o aborto.....	25
5.5.7 Análisis estadístico.....	25
5.5.8 Aspecto ético.....	26
VI. RESULTADOS	27
VII. DISCUSIÓN	29
VIII. CONCLUSIONES.....	32
IX. RECOMENDACIONES.....	33
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
XI. ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 BHCG Positivo ICSI vs PICSI	38
TABLA 2 EMBARAZO CLÍNICO ICSI vs PICSI	38
TABLA 3 ABORTO ICSI vs PICSI	38
TABLA 4. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LAS DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR ENTRE ICSI CONVENCIONAL Y ICSI CON ÁCIDO HIALURÓNICO, SEGÚN VARIABLES.....	39
TABLA 5. ICSI CONVENCIONAL VERSUS ICSI - AH	39

I. INTRODUCCIÓN

Existe alrededor de 40% de parejas que acuden a las técnicas de reproducción asistida no logran un embarazo clínico.

Un fracaso en los intentos de reproducción asistida tiene varias consecuencias económicas y emocionales en las parejas que asisten por ayuda a los centros que brindan estos servicios de reproducción asistida. Esto hace que haya necesidad de seguir extendiendo la investigación sobre factores causales o predictores de falla en estos procedimientos, tanto para mejorar predicciones de pronóstico como para establecer medidas de potenciación de las técnicas disponibles, de tal manera que la probabilidad de alcanzar el embarazo sea más alta.

El propósito de la presente investigación es encontrar evidencia de que la técnica de PICSI (Inyección fisiológica Intracitoplasmática de espermatozoides) a comparación de la técnica de ICSI (Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides) convencional puede mejorar las tasa de embarazo en pacientes mujeres que van dirigidas a ovo donación en técnicas de reproducción asistida.

El biólogo podrá proporcionar a las parejas información más exacta acerca de las probabilidades de éxito a priori según sea la técnica que se usará para realizar su procedimiento.

Esto ayudará a las parejas a tomar sus decisiones con mayor grado de confianza. Asimismo, esta información predictiva ayudará al equipo médico y de laboratorio a orientar mejor las decisiones clínicas y de laboratorio según sus probabilidades de éxito, con la consecuente ganancia en tiempo y administración de recursos utilizados en el proceso.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

-Evaluar el impacto del procedimiento de selección espermática por ácido hialurónico en los resultados de los ciclos de reproducción con ovocitos de donante.

2.2 Objetivos Específicos:

-Evaluar si la selección espermática por ácido hialurónico mejora el desarrollo embrionario.

-Evaluar si los embriones producidos luego de la selección espermática por ácido hialurónico mejora la tasa de implantación

III. MARCO TEÓRICO

La Infertilidad se define según la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la enfermedad del sistema reproductivo, definida como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas (Zegers-Hochschild et al.,2009)

La infertilidad afecta a alrededor del 10-15% de la población en edad reproductiva. Alrededor del 20% de los casos de infertilidad las técnicas de evaluación estándar no detectan las patologías, esto se hace llamar infertilidad inexplicada (Kovacs et al.,2011) en 2010 se estimó que más de 48,5 millones de parejas de todo el mundo padecían problemas de infertilidad (Mascarenhas et al., 2012). En el caso de la infertilidad inexplicada, varios mecanismos patógenos podrían desempeñar un papel. Endometriosis, factores inmunológicos, genéticos y las causas no diagnosticadas todos podrían ser responsables (Gleicher et al., 2006).

A lo largo del tiempo, se ha venido estudiando diversas técnicas de reproducción asistida, empleando como modelo a los animales, para luego aplicarlas a humanos.

3.1 Técnicas de reproducción asistida

3.1.1 Inseminación artificial

Consiste en la introducción de los espermatozoides previamente capacitados mediante un catéter en la vagina de la mujer. Luego, los espermatozoides llegan hasta el óvulo y la fecundación se efectúan de modo idéntico a lo que sucede en el proceso fisiológico normal. (Santamaría, 2000)

3.1.2 FIV

Los óvulos y espermatozoides se cultivan en el laboratorio conjuntamente en condiciones favorables para su unión espontánea.

3.1.3 ICSI

Es una forma de fertilización in Vitro dirigido a parejas infértiles que debido a múltiples factores, los espermatozoides no tienen la capacidad de penetrar al interior del ovocito. Cuando esto ocurre, es necesario facilitar la fecundación, inyectando un espermatozoide al interior del ovocito. Esto se realiza usando equipos de magnificación (microscopio invertido), equipado con sistemas hidráulicos que permiten introducir el espermatozoide suavemente, usando una finísima aguja de vidrio. (Manual FERTILAB, 2014)

3.1.4 ICSI con ácido hialurónico

El AH es un polisacárido aniónico lineal compuesto de N-acetil-D-glucosamina y ácido glucurónico D- atado con β -1-3 y 1-4 β -enlaces glucosídicos, relacionado con la familia de glicosaminoglicano, macromolécula que se encuentra en grandes cantidades en fluidos corporales (Saylan A. et al., 2016) y es uno de los principales compuestos de la matriz extracelular de cumulus oophorus que se encuentra alrededor del oocito el cual parece desempeñar un papel importante en la fertilización natural del ser humano. El uso de este polisacárido se basa en la teoría de que el AH es un constituyente principal de la matriz cumulus oophorous y puede desempeñar un papel crítico en la selección de espermatozoides maduros, funcionalmente competente durante la fertilización in vivo (Peterson C. G. et al., 2010). Estos espermatozoides son capaces de unirse de forma permanente a AH in vitro, ya que al estar maduros nos indica que han completado el proceso de espermatogénesis de remodelación de la membrana plasmática, extrusión citoplasmática, y la madurez nuclear (Huszar G. et al., 2003) Estos espermatozoides maduros tienen una alta densidad de receptores de 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 Zona pelucida. Por el contrario, en espermatozoides inmaduros con deficiente remodelación de la membrana citoplasmática no tienen capacidad para

unirse al AH (Cayli S. et al., 2003) en espermatozoides que no están maduros, existe una deficiencia en la zona pelúcida y los sitios de unión del AH.

3.2 Infertilidad masculina

Dado que el factor masculino representa aproximadamente la mitad de los casos de infertilidad, el estudio del varón supone una parte esencial en el análisis de la pareja estéril.

Puede ser afectada por varios factores como fallos durante la espermatogénesis o durante la adquisición de la capacidad fecundante producen espermatozoides no funcionales o de baja calidad y por tanto infertilidad (Toshimori et al., 2004). Además, cambios congénitos o adquiridos en el tracto urogenital, infecciones y distintos factores endocrinos, genéticos e inmunológicos pueden ser los causantes de la incapacidad del varón para tener descendencia (Benvold, 1989; Khorram et al., 2001). Por lo que estas causas deben ser examinadas y evaluadas, con el fin de conseguir un correcto diagnóstico del origen de la infertilidad (Sharlip et al., 2002; Dohle et al., 2005; Matorras y Hernández, 2007).

3.2.1 Estudio inicial de la infertilidad masculina

La evaluación inicial de la esterilidad masculina debe incluir (Dohle et al., 2005; Matorras y Hernández, 2007):

a.-Anamnesis completa

Antecedentes de interés andrológico (gestación y parto propio, desarrollo y pubertad, historia genitourinaria, existencia de patologías de riesgo). Historia reproductiva (duración infertilidad, gestaciones producidas, función sexual). Enfermedades generales relevantes. Exposición a factores con efecto negativo sobre la fertilidad (medicamentos, laborales, estilo de vida). Historia familiar, incluyendo número de hermanos, antecedentes de infertilidad, fibrosis quística, hipogonadismo, criptorquidia y azoospermia en hermanos varones.

b.- Exploración física

Hábito somático, datos antropométricos y caracteres sexuales secundarios. Genitales externos: pene, región inguinal, escroto, testículos, epidídimo, conductos deferentes o cordones espermáticos, incluyendo plexo venoso. Tacto rectal para exploración prostática.

c.- Análisis del semen

El análisis del semen indica el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y orienta a cerca de patologías del tracto genital. De forma que, aunque los resultados no permiten determinar con certeza si un individuo es fértil o no, puede proporcionar información acerca de problemas en los órganos genitales del varón (Matorras y Hernández, 2007). Como ya se ha comentado anteriormente, se deben realizar, al menos, dos espermogramas para establecer el perfil basal del paciente. Éstos, deben ser realizados y valorados según los métodos y criterios descritos por la OMS (OMS, 2010).

Dependiendo de los resultados obtenidos en este estudio inicial de la infertilidad masculina se pueden solicitar una serie de pruebas complementarias y/o estudios genéticos. Las pruebas complementarias que se pueden realizar son: pruebas de función espermática, ecografía y ultrasonografía doppler escrotal, ecografía transrectal, el estudio bacteriológico del semen y el análisis de orina post-orgasmo. En cuanto a los estudios genéticos, se pueden determinar: el cariotipo, microdeleciones del cromosoma Y, mutaciones del gen CFTR (gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística) y el estudio de los cromosomas meióticos (Matorras y Hernández, 2007).

IV. ANTECEDENTES

Huszar G, et al., 2003: Se realizó comparaciones de los espermatozoides en el semen y en fracciones de espermatozoides unidos al ácido hialurónico. Las madures de los espermatozoides fueron probadas por inmunocitoquímica en creatina quinasa y antisueros de HSPA2, azul de anilina para la tinción de la cromatina y tinción *Pisum sativum* lectina que revela la integridad acrosomal y el kit de viabilidad FertiLight para destacar el esperma viable y no viable. Se observó que todos los marcadores de la maduración del esperma y la inmadurez apoyan la hipótesis de que los espermatozoides que se encuentra unidos al ácido hialurónico se encuentran maduros.

Celik-Ozenc C. et al 2004. Se realizó microscopía de contraste de fase y FISH, utilizando sondas centroméricas de los cromosomas X, Y, 10, 11 y 17 en muestra espermática de 15 pacientes. Se estudiaron 1286 espermatozoides por tres criterios: dimensiones de la cabeza y de la cola, forma de la cabeza y la morfología estricta de Kruger. Se observó una relación entre las dimensiones de espermatozoides anormales y el aumento de frecuencias de aberraciones cromosómicas numéricas. Sin embargo, 68 de los 256 disómicos, y 4 de 130 espermatozoides diploides mostraron cabeza y cola dimensiones comparables con el tercil más normal, más baja de los 900 espermatozoides haploides. Teniendo en cuenta los 1286 espermatozoides, entre los que tenían la forma más regular, había 63 y cinco con núcleos disómicos y diploides, respectivamente. De acuerdo con estos hallazgos, entre los 256 espermatozoides disómico, 10% eran Kruger normal. Se concluyó que las dimensiones o forma de los espermatozoides no son atributos fiables en la selección de los espermatozoides para ICSI haploides

Jakab A. et al., 2005, Espermatozoides seleccionados y no seleccionados con Ácido Hialurónico fueron tratados con fluorescencia de hibridación in situ con sondas centroméricas para los ejes X, Y, y 17 cromosomas. Para el esperma seleccionado con Ácido Hialurónico frente a los espermatozoides no seleccionados las

frecuencias de disomía cromosómicas se redujeron a 0,16% del 0,52%, diploidia a 0,09% de 0,51 %, y el sexo cromosómico disomía a 0,05% del 0,27%

Worrilow K.C. et al., 2006 Se evaluaron tres grupos. Grupo A pacientes para ICSI, grupo B pacientes para PICSI y el grupo C (PICSI o ICSI), grupo control. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de fertilización, ni en la morfología del cigoto, embrión y blastocisto. Entre grupo A y B las diferencias en la tasa de conversión de blastocisto no fueron estadísticamente significativo. Sin embargo la tasa de embarazo clínico para los pacientes del grupo A (25,0%) fue estadísticamente inferior a la de B (57,1%) y en C (57,1). Las tasas de aborto espontáneo fueron estadísticamente mayor en el grupo A. Se puede concluir que los espermatozoides unidos al ácido hialurónico llevan a una menor frecuencia de aneuploidía cromosómica y puede ejercer una paterna positiva influencia en la embriogénesis de preimplantación.

Worrilow K.C et al., 2007. Se evaluó 240 ciclos entre ICSI Y PICSI. La tasa de fertilización de los oocitos en PICSI (62%) fue estadísticamente mayor que la de los de control de oocitos ICSI (61%) Embriones derivados de PICSI (6,8%) demostraron una disminución estadísticamente significativa en la fragmentación en comparación con sus homólogos de ICSI (8,4%). La beta hCG + y las tasas de embarazo clínico para los pacientes PICSI (70%, 50%) fueron mayores que los observados en los pacientes de ICSI (62%, 40%). Las tasas de aborto espontáneo fueron estadísticamente inferior en los pacientes PICSI.

Nasr-Esfahani M.H. 2008 Se obtuvieron 50 muestras de espermatozoides obtenidos para ciclos de FIV. Se comparó El método de selección de espermatozoides de rutina con el de ácido hialurónico para evaluar tasa de fecundación, desarrollo embrionario, la implantación y las tasas de embarazo. También se evaluó la relación entre la capacidad unión del ácido hialurónico con la deficiencia de protamina y la fragmentación del ADN. Se observó una correlación inversa significativa entre el porcentaje de unión de ácido hialurónico con la deficiencia de protamina, la fragmentación del ADN y la morfología anormal de espermatozoides. Los oocitos inyectados con espermatozoides seleccionados por ácido hialurónico tenían significativamente más alta la tasa de fertilización, mientras que las tasas de embarazo e implantación se incrementaron de manera insignificante.

Parmegiani L. et al., 2009 Se observaron retrospectivamente 293 parejas con selección espermática con Ácido Hialurónico en comparación con 86 parejas tratadas ICSI convencional. Este estudio mostró que la inyección de espermatozoides unidos ácido hialurónico mejora significativamente la calidad del embrión y la implantación.

Parmegiani L. et al., 2010 Se realizaron 3 grupos de estudio. En el grupo 1 se determinó la fragmentación de ADN de esperma de espermatozoides unidos al ácido hialurónico frente a espermatozoides unidos al PVP. En el grupo 2 se evaluó la morfología nuclear de espermatozoides unidos al ácido hialurónico frente a los espermatozoides en PVP. En el grupo 3 se hizo un estudio aleatorizado para ver la calidad y el desarrollo embrionario entre espermatozoides unidos al ácido hialurónico frente a los espermatozoides en PVP. El estudio demostró que los espermatozoides unidos al ácido hialurónico la fragmentación de ADN de espermatozoides tiene una reducción significativa y una mejora significativa en la normalidad núcleo en comparación con los espermatozoides inmerso en PVP. Por otra parte, la inyección de espermatozoides unidos al ácido hialurónico mejora significativamente la calidad y el desarrollo embrionario.

Petersen C. et al., 2010 Se evaluaron un total de 16592 espermatozoides preparados y clasificados en dos grupos: Grupo I, los espermatozoides que presentó su cabeza unida ácido hialurónico y el Grupo II, los espermatozoides que no se adhieren a la sustancia ácido hialurónico frente a su morfología. No se obtuvieron diferencias significativas con respecto a la morfología de dos grupos de estudio. Los resultados sugieren que el ensayo de unión de HA ha limitado la eficacia en la selección de espermatozoides móviles con morfología normal con una gran ampliación.

Yaggi A. et al., 2010 Se estudió 50 muestras espermáticas. Se evaluó la integridad del ADN y sus respectivas fracciones de espermatozoides unidos al ácido hialurónico. La proporción de espermatozoides alta integridad del ADN y de ADN fragmentado fueron 54,9% y 45,0% mientras que en la fracción de espermatozoides con destino a la unión con ácido hialurónico, las proporciones respectivas eran 99% y 1,0%, respectivamente. Los datos demostraron que de hecho HA muestra un alto grado de selectividad para los espermatozoides con una alta integridad de ADN.

Portella J. et al., 2011 Compararon diferencias entre ciclos de ICSI a través de la selección espermática convencional con la selección por unión al ácido hialurónico, selección morfológica de espermatozoides por alta magnificación (IMSI), las columnas de anexina-V . Al comparar los resultados reproductivos en los ciclos de ICSI a través de la selección espermática convencional con la selección por unión al AH, se encontró una mejor tasa de fecundación, mejor calidad embrionaria y mejor tasa de implantación, en el grupo seleccionado por AH. Sin embargo, ningún estudio encontró diferencias en cuanto a tasa de embarazo y tasa de aborto.

Beck-Fruchter R., et al., 2016. Se realizó una revisión sistemática y meta análisis de base de datos electrónicas hasta junio del 2015 El uso de la técnica de selección de espermatozoides por ácido hialurónico no produjo ninguna mejora en las tasas de fertilización y embarazo. El meta-análisis de todos los estudios disponibles mostró una mejora en la calidad del embrión y la tasa de implantación; un análisis de estudios prospectivos sólo mostró una mejora en la calidad del embrión.

Saylan A., et al., 2016. Se Colecto 20 muestras espermáticas de pacientes que fueron divididas en dos grupos. Aun grupo se le añadió Acido Hialurónico al 10% y al otro Albumina de suero humano 0. 0.5%. y se le aplico el método de Swim up. Luego pasaron por columnas de anexinas V para determinar la tasa de apoptosis de espermatozoides. Se encontró una tasa de apoptosis significativamente mayor en el grupo Albumina en comparación con el grupo Ácido hialurónico.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar De Ejecución

Laboratorio de Embriología y Andrología del Centro de Fertilidad y Reproducción Asistida (CEFRA), Avenida Guardia Civil 715 San Borja

5.2 Tipo de investigación.

Se realizó un trabajo retrospectivo de los años 2012, 2013 y 2014

5.3 Diseños de investigación

Los ciclos de ICSI convencional y selección espermática por ácido hialurónico se realizaron en los años 2012, 2013 Y 2014 siendo un total de 187 ciclos. Las donantes de oocitos tienen edad entre los 18 y 30. La calidad seminal involucra pacientes normozoospermicos hasta oligoastenoteratozoospermicos que se encuentra distribuida equitativamente en los grupos de pacientes generados para el estudio. Nuestro criterio de exclusión fue pacientes receptoras con endometrios.

5.4 Operacionalización de las variables

5.4.1 Grupos de estudio

a.- Grupo I: ICSI Convencional

Inyección intracitoplasmática de un solo espermatozoide, seleccionado por su morfología y motilidad, directamente en el citoplasma de un ovocito en metafase II.

b.- Grupo II: ICSI con ácido hialurónico

Inyección intracitoplasmática de un solo espermatozoide seleccionado por su madurez mediante el ácido hialurónico directamente en el citoplasma de un ovocito en metafase II.

5.4.2 Variables Independientes

- Edad de la Paciente: 26 -50 años
- Número de ovocitos inyectados: 5-15 ovocitos por paciente.

5.4.3 Variables Dependientes

- Volumen de la muestra espermática: mayor a 1ml
- Concentración de espermatozoides: mayor a 10 millones por mililitro
- Motilidad de espermatozoides: mayor a 20 % de motilidad
- Número de ovocitos fecundados: ovocitos con presencia de 2 pronúcleos y 2 cuerpos polares
- Tasa de ovocitos fecundados: Número de ovocitos con presencia de 2 pronúcleos y 2 cuerpos polares sobre el número de ovocitos inyectados expresado en porcentajes.
- Grado de embrión al 3er día: Bueno (embriones con 4 a 12 blastómeros sin fragmentos o mórulas) Regular (embriones con 4 a 12 blastómeros con pocos fragmentos) Malo (embriones con 2 a 12 blastómeros con varios fragmentos)
- Grado de embrión al 5to día: Bueno (Masa celular y trofoblasto bien definido y expandido) Regular (Masa celular y trofoblasto definidos) Malo (Masa celular y trofoblasto no se encuentran definidos o con muy pocas células)
- Tasa de blastulación: Numero de blastocistos producidos al 5to y 6to día sobre el número de ovocitos fecundados.
- Tasa de embarazo bioquímico: Evidencia de la concepción basada en el dato bioquímico del suero antes de realizarse la ecografía. Número de pacientes

transferidas con datos bioquímicos positivos sobre el total de pacientes transferidas expresadas en porcentajes.

- Tasa de embarazo clínico. Presencia de uno o más sacos embrionarios con latidos después del Beta-HCG positivo. Número de pacientes transferidas con uno o más sacos embrionarios con latidos sobre el total de pacientes transferidas expresadas en porcentajes.
- Tasa de abortos. Número de pérdidas de embarazos clínicos antes de las 20 semanas de gestación divididos por el total de número de embarazos clínicos.

5.5 Diseño Experimental

5.5.1 Obtención y procesamiento de la muestra seminal

a.- Obtención de la muestra seminal.

Se evaluó a 187 pacientes. La muestra seminal se obtuvo cerca al laboratorio para evitar fluctuaciones de temperatura. Se obtuvo mediante masturbación. El paciente recibió el eyaculado en un frasco colector Samplix de boca ancha. Luego se entregó al personal de laboratorio de andrología el cual lo llevó a la incubadora a 37° para su licuefacción durante 30 minutos.

b.- Evaluación de la muestra seminal

Se evaluó el volumen de la muestra con una pipeta de Samplix. Se colocó 10 µl de muestra seminal en una lámina portaobjeto cubierta con la laminilla cubreobjeto para evaluar la motilidad. En la cámara Makler se colocó 5 µl de muestra seminal para evaluar concentración. Se evaluó la motilidad y la concentración en el microscopio Zeiss.

c.- Preparación de la muestra seminal.

Se preparó en un tubo cónico de 15 mL Falcon una columna formando dos capas de 1.0 mL., una solución de alta densidad (Allgrad 90% de Life Global) y otra de solución de baja densidad (Allgrad 45% de Life Global). Se colocó la muestra

seminal suavemente a través de las paredes del tubo de la columna de densidad en un volumen de 1.5 mL como máximo. Se centrifugó a 350G durante 18 minutos en una centrifuga Boeco Germany. Al término se retiró las capas superiores con uso de una pipeta de transferencia sin mover la capa del fondo y se desecha. Se rescató el pellet de la columna con una pipeta Pasteur Sigma Aldriche y se colocó en un tubo nuevo de 15 mL contiendo 2 mL de medio de lavado Global con Hepes de Life Global. Se homogeniza y se centrifuga a 300G por 8 minutos. Se decanta el sobrenadante y nos quedamos con el pellet para su posterior uso en la microinyección.

5.5.2 Obtención y procesamiento de oocitos

a.- Estimulación ovárica

Se indució a las donantes una ovulación múltiple mediante hormonas implicadas en la regulación de la reproducción, como citrato de clomifeno, solo o combinado con hMG (concomitante o secuencial), hMG, FSH purificada, sola o combinada con hMG, FSH urinaria altamente purificada y FSH recombinante. Se inyectaron por vía subcutánea o intramuscular, la dosis la determinó el médico según la edad de la paciente, morfología de los ovarios, masa corporal y la analítica hormonal. Es necesario hacer los controles regulares de este proceso mediante ecografías que se deberá repetir hasta observar folículos de 18 mm de diámetro y análisis de sangre de Estradiol para el control del crecimiento y maduración folicular y determinar con exactitud la extracción de los óvulos. Para la maduración de los óvulos es necesario administrar la HCG 36 horas antes de la extracción de los óvulos.

b.- Aspiración folicular.

La aspiración folicular se realizó en el quirófano con la ayuda de una ecógrafo transvaginal. Con la ayuda de una aguja Rocket número 18 se llevó a cabo la punción ovárica para la obtención de los folículos. A la paciente se le administró

anestesia ya sea local o general. El líquido folicular aspirado se llevó al laboratorio de embriología para el reconocimiento de los ovocitos y valorar su estado de maduración por el Embriólogo.

Una vez terminado el proceso la paciente permaneció ingresada en el centro bajo observación durante unas horas, siempre y cuando no sea necesario un seguimiento más exhaustivo.

c.- Reconocimiento de ovocitos

El líquido folicular se coloca en una placa Petri Samplix. El embriólogo observó los folículos bajo el estereoscopio Motic sobre una platina termina a 37°C que se encuentra dentro de una cámara de flujo laminar, se lavaron del líquido folicular y se colocaron en una placa de cultivo de 1 pozo Ref. 353037 con medio *Global con hepes* de Life Global. Posteriormente se desnudaron por digestión enzimática con hialuronidasa de concentración 80 IU de y con la ayuda de una pipeta de vidrio Sigma Aldriche mediante aspiración mecánica. Luego de ser desnudados se evaluó el estado de madures el cual debe encontrarse en metafase II (MII) presentando el primer corpúsculo polar. Estos oocitos fueron utilizados para realizar la microinyección.

5.5.3 Microinyección de oocitos.

a.- ICSI convencional

En una placa se colocaron gotas de 5uL de medio con Global con hepes de Life Global donde se colocaron los ovocitos y en el centro una gota con medio PVP de Origio donde se despositaron la muestra de semen previamente capacitada el cual disminuyen su motilidad y permiten su manejo y captura. Para realizar el ICSI se utilizó una aguja Holding e ICSI de Life Global. Se visualizó a los espermatozoides y se seleccionó por su morfología y su motilidad, en donde un solo espermatozoide se introdujo en un ovocito maduro.

b.- ICSI con ácido hialurónico

Para el ICSI con solución de ácido hialurónico, los espermatozoides se seleccionaron en base a su habilidad para unirse al de ácido hialurónico indicándonos la madurez del espermatozoide. Se colocaron en una gota de 5µl de muestra espermática, el cual se unió con otra gota de 5 uL de medio que contiene AH (SpermSlow™; Origio) por una pipeta y luego se incubó a 37°C por unos minutos. Los espermatozoides unidos al AH son fácilmente separados con la pipeta de inyección y posteriormente se inyectaron en los oocitos.

5.5.4 Valoración de la fecundación y calidad embrionaria

Una vez realizado el ICSI convencional o el ICSI con HA los oocitos microinyectados se colocaron en gota dentro de una placa de cultivo Ref. 353002 con medio Global Medium de Life Global cubierto por aceite mineral de Life Global durante 17-20 horas en la incubadora Galaxy a 37°C y 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo para poder observar si el ovocito microinyectado a fecundado, se evaluó si existe la presencia de los dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

Al tercer día se reevaluaron por criterios morfológicos como son el número e igualdad de las blastomeras; el porcentaje, tipo de fragmentación y presencia de vacuolas. Se sigue un sistema de gradación para clasificar los embriones, desde la categoría I a la IV. El grado I se asigna al embrión con óptima calidad y el IV a los que menos. A cada uno se le asigna el número de blastómeros que se encuentran en cada embrión.

Al quinto día se volvió a evaluar a los embriones para saber cuántos de ellos han llegado hasta la etapa de blastocisto. Los criterios morfológicos se basan en la calidad de masa celular interna, el trofoctodermo, células muertas y el tamaño. El sistema de gradación se clasifica desde el tamaño como blastocisto inicial,

intermedio, expandido o hatching; masa celular interna y el trofocotodermo desde la categoría A siendo el de mejor calidad hasta la C con menor calidad.

5.5.5 Transferencia embrionaria

Al evaluar los embriones según sea su calidad se decidió el día de la transferencia embrionaria pudiendo ser tercer o quinto día. La paciente receptora se debe aplicar la progesterona por vía vaginal en óvulos o por medio de ampollas. A la paciente se le realizó un seguimiento endometrial para saber cuáles son las concentraciones de estradiol de la paciente. El endometrio debe tener un grosor mayor o igual a 6 mm. Se introdujo en la cavidad uterina un catéter con sonda flexible, junto con una pequeña cantidad de medio de cultivo y los embriones seleccionados.

5.5.6 Diagnóstico de embarazo o aborto

Después de 13 días de la transferencia embrionaria se tiene como diagnóstico precoz de embarazo o embarazo bioquímico la medición cuantitativa de la concentración de B-hCG en sangre. En los casos que fueron positivos, se citó a la paciente a consulta a los 15 días del análisis para confirmar el embarazo mediante ecografía. Cuando fue negativo se interrumpió la medicación y en un plazo de tres meses se podrá iniciar un nuevo ciclo. Cuando hubo ausencia de latido fetal tras la ecografía positiva, nos confirmó la presencia de un aborto.

5.5.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en este trabajo se realizó mediante el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.0.1. 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 son considerados como indicativos de significación estadística.

5.5.8 Aspecto ético

Actualmente en el Perú las técnicas de reproducción asistidas no se encuentran reguladas por algún aspecto ético. Sin embargo, existen numerosos centros privados que ofrecen tratamientos de reproducción asistida de alta y baja complejidad y se rigen básicamente mediante autorregulación, difiriendo en los tipos de tratamiento, los costos y el enfoque de prácticas problemáticas. Las clínicas que ofrecen tratamientos de alta complejidad incluyen tanto la posibilidad de acudir a la ovodonación, el diagnóstico preimplantatorio y la crioconservación de embriones. El acceso a los tratamientos contra la infertilidad ha sido considerado dentro de los derechos reproductivos y, lógicamente, del derecho a la salud, a beneficiarse de los adelantos de la tecnología y al proyecto de vida. (Siverino-Bavio P. 2012)

Al ser este un trabajo retrospectivo, se ha pedido consentimiento a la clínica para poder usar sus datos con propósito de investigación, cuidando la identidad de cada paciente. **CARTA 1.**

VI. RESULTADOS

Nuestro objetivo en este trabajo es evaluar el impacto del procedimiento de selección espermática por ácido hialurónico en los resultados de los ciclos de reproducción con ovocitos de donante. Se realizó un estudio retrospectivo con 187 ciclos de pacientes transferidas comparando 153 pacientes que se realizaron ICSI convencional y 34 pacientes que se realizaron ICSI con ácido hialurónico. No se encuentra diferencia significativa entre la edad del varón, el volumen, concentración, motilidad espermática, el número de ovocitos inyectados, fecundados y embriones transferidos. La edad media de las donantes de los ovocitos para ICSI convencional es de 22 y para ICSI con ácido hialurónico es de 23, en pacientes receptoras de los ovocitos para ICSI convencional es de 41 y para ICSI con ácido hialurónico es de 42, en caso de varones para ICSI convencional es de 41 y para ICSI con ácido hialurónico es de 40.5. La media del volumen seminal de pacientes para ICSI convencional es de 2.0 ml y para ICSI con ácido hialurónico es de 2.5 ml. La media para la concentración espermática en pacientes para ICSI convencional es de 44 millones por mililitro y para ICSI con ácido hialurónico es de 47 millones por mililitro. La media para la motilidad espermática en pacientes para ICSI convencional es de 50% y para ICSI con ácido hialurónico es de 50.5%. La media de los ovocitos inyectados para ICSI convencional es de 8 y para ICSI con ácido hialurónico es de 7. La media de los ovocitos fecundados para ICSI convencional es de 7 y para ICSI con ácido hialurónico es de 6.5. La media de los embriones transferidos para ICSI convencional es de 2 y para ICSI con ácido hialurónico es de 2. (TABLA 4)

No existe diferencia significativa entre la tasa de embarazo bioquímico, embarazo clínico, abortos y tasa de blastulación. El porcentaje de pacientes que llegan a embarazo bioquímico presentando Beta-HCG positivo por transferencia para ICSI convencional es de 80.39% y ICSI con ácido hialurónico es de 76.47%. El porcentaje de pacientes que llegan a embarazo clínico por transferencia para ICSI convencional es 74.5% y ICSI con ácido hialurónico es 70.58%. El porcentaje de la tasa de aborto por transferencia para ICSI convencional es 12.28 % y ICSI con ácido

hialurónico es 16.6% (TABLA 5) %. El porcentaje de la tasa de blastulación para ICSI convencional es 46.06 % y ICSI con ácido hialurónico es 44.63% (TABLA 5)

VII. DISCUSIÓN

Actualmente la infertilidad afecta un 15% de parejas en edad reproductiva, este se convierte ya en un problema no solo médico sino mundial (Mascarenhas et al., 2012). Es por esta razón que el desarrollo de los tratamientos de reproducción asistida nos da la posibilidad de aumentar las posibilidades de éxito reproductivo (Khorram et al., 2001; Chemes y Álvarez Sedo, 2012). Para evaluar la capacidad fecundante del varón se realiza el análisis del semen que constituye la única herramienta diagnóstica y pronóstica. Pero por el contrario, nos limita en casos donde la infertilidad es de origen desconocido (Guzick et al., 2001; Lewis, 2007; Garrido et al., 2008).

Dentro de las técnicas usadas en reproducción asistida surgió el ICSI, (Carrell DT. Et al 2007) la cual permitió aumentar las tasas de fertilización, mejorando los resultados en reproducción asistida. Por lo contrario, las tasas de embarazo siguen siendo relativamente bajas (Wright et al., 2008). El riesgo que existe con esta técnica es el aumento de inyectar espermatozoides con anomalías genéticas o funcionales (Parmegiani L. et al., 2010) ya que se ha demostrado que observar 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)

Otros autores indican 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 (Bonet et al., 2012). Pero son numerosos los autores que indican que el daño del ADN si está relacionado con bajas tasas de embarazo y el aumento del riesgo de aborto en técnicas de ICSI (Zini et al., 2008) Por este motivo es que el ICSI convencional es un punto crítico, donde es importante buscar la selección espermática previa.

El ácido hialurónico (AH) tiene una función de selección natural del espermatozoide. La capacidad del esperma para unirse a AH se puede utilizar para evaluar la madurez de esperma (Huszar G. et al., 2007) . Los espermatozoides inmaduros

también muestran una mayor retención de la creatina quinasa y otras enzimas citoplasmáticas, aumento de los niveles de peroxidación de lípidos y la consecuente fragmentación de ADN, y una morfología anormal de espermatozoides (Huszar G. et al., 2007) El estatus cromosómica y la integridad de la cromatina no son predecibles en la observación de la dimensión y forma de los espermatozoides (Celik-Ozenci, C et al., 2004) Los ovocitos que son fertilizados con espermatozoides con ADN dañado puede conducir a un mayor riesgo de pérdida del embarazo (Zini et al., 2008).

El objetivo de nuestro trabajo comparar los resultados entre técnica de ICSI convencional y la técnica de ICSI con AH y evidenciar si esta última puede mejorar las tasa de embarazo en pacientes mujeres que van dirigidas a ovo donación en técnicas de reproducción asistida.

Se transfirieron solo embriones de buena calidad a 187 pacientes. Se analizo la tasa de aborto y embarazo. Siendo 153 transferencias para ICSI convencional y 34 transferencias para ICSI con AH. Para evitar el sesgo que puedan causar los ovocitos en los resultados, se utilizaron ambas técnicas ovocitos de donantes sanas. Actualmente existe una gran controversia y muy poca unanimidad en cuanto a los resultados obtenidos con este método. En general los estudios apuntan que no mejora la fertilización con PICS (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 encontraron una correlación positiva significativa entre la fertilización y el ICSI con AH, y Nasr-Esfahani y su grupo (2008), obtuvieron tasas de fertilización significativamente más elevada en ICSI con AH.

En nuestro trabajo no se obtuvo diferencias significativas en la tasa de embarazo, al igual que Nasr-Esfahani et al., 2008 donde se realizó 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. Se encontraron datos similares en un estudio realizado por Van der Bergh et al., 2009 donde se utilizó las técnicas de ICSI convencional e ICSI con AH en 44 pacientes inyectando a los ovocitos de forma aleatoria, la cual no se observó diferencias respecto a las tasas fertilización, tasas de transferencia, nº de embriones y calidad de éstos.

El grupo de Parmegiani (2010) realizó un estudio con 232 pacientes a los que de manera aleatoria se realizó ICSI convencional e ICSI con AH, obteniendo diferencias significativamente más altas en calidad embrionaria y en el ratio de desarrollo embrionario con ICSI con AH; sin embargo tampoco obtuvieron diferencias en fertilización, embarazo, implantación ni aborto.

Al no encontrar diferencias significativas entre las dos técnicas realizadas, esto podría deberse al que las transferencias embrionarias se han realizado solo con embriones viables y de óptima calidad. Lo cual indica, que los embarazos no están influenciados por el tipo de selección espermática utilizado, sino por la calidad de los embriones transferidos.

Sauerbrun-Cutler M.-T. et al., 2013 demostraron en su trabajo realizado que no existe diferencia significativa entre ICSI y PCSI sin embargo hubo una tendencia a aumentar las tasas de fertilización para PCSI. Esto nos puede indicar que debemos de seleccionar muestras espermáticas con pronósticos más bajos para ser sometidos a PCSI.

En relación con la tasa de aborto Balaban et al., 2003 realizó un estudio en el que a 48 pacientes se les realizó ICSI con AH y a 44 con ICSI convencional, no obteniendo diferencias significativas en fertilización, división, calidad embrionaria, embarazo, implantación ni en abortos. Sin embargo, WorriLOW et al., 2007 realizó un estudio con 240 pacientes donde observó una tendencia de disminución de los abortos con el uso de AH. En nuestro caso, el estudio no se encuentra diferencias significativas entre ICSI convencional e ICSI con AH.

En los estudios previos realizados se ha utilizado ovocitos de pacientes infértiles donde se puede ver influenciado la calidad intrínseca de los ovocitos propios frente al estudio realizado con óvulos de donantes sanas (Programa de ovo-donación-CEFRA) cuya ventaja es tener una población homogénea con óvulos de calidad óptima y fertilidad comprobada. Otra de las razones podría ser que tenemos que el grupo de estudio de ICSI con ácido hialurónico el tamaño de muestra es menor frente al ICSI convencional. Finalmente, aún nos queda duda si seguimos usando la técnica de ICSI convencional como rutina o si buscamos como alternativa el uso de la técnica de ICSI con AH.

VIII. CONCLUSIONES

1.- No se encontró diferencias significativas en las tasas de embarazo obtenidas entre la técnica de selección espermática convencional frente a los procedentes de selección espermática con AH.

2.- La tasa de embarazo está correlacionada con la calidad de los embriones transferidos.

3.- No se encontró diferencias significativas en las tasas de aborto en las pacientes a las que se les transfiere al menos un embrión de buena calidad procedente de las técnicas usadas.

IX. RECOMENDACIONES

Se debería investigar más sobre la técnica de ICSI con ácido hialurónico para obtener información más confiable, ayudando en forma conjunta al equipo médico y de laboratorio a orientar mejor las decisiones clínicas y de laboratorio según sus probabilidades de éxito. Esta información nos ayudará a poder proporcionar a las parejas información más exacta acerca de las probabilidades de éxito a priori según sea la técnica que se usará para realizar su procedimiento. Esto a su vez ayudará a las parejas a tomar sus decisiones con mayor grado de confianza respecto al procedimiento a realizarse.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Beck-Fruchter R., Shalev E., Weiss A., a Clinical benefit using sperm hyaluronic acid binding technique in ICSI cycles: asystematic review and meta-analysis, *Reproductive BioMedicine Online* (2016) 32, 286–298
3. 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.
4. Carrell D.T., Emery B.R., Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction Update*, Vol.13, No.3 pp. 313–327, 2007
5. 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
6. 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;19:1052–1059.
7. Chemes HE and Alvarez Sedo C. Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J Androl* 2012;14:14-23.
8. 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.
9. 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.

10. Garrido N, Remohi J, Martinez-Conejero JA, Garcia-Herrero S, Pellicer A and Meseguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online* 2008;17:855-865.
11. Gleicher N, Barad D. Unexplained infertility: does it really exist? *Hum Reprod.* 2006; 21:1951-5
12. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388-1393.
13. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online.* 2007 May;14(5):650-63. Review
14. Huszar G., Ozenci C.C., Cayli S., Zavaczki Z., Hansch E., Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status *Fertility and sterility* Vol. 79, Suppl. 3, June 2003
15. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril.* 2005 Dec;84(6):1665-73.
16. Khorram O, Patrizio P, Wang C and Swerdloff R. Reproductive technologies for male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2373-2379.
17. Kovacs P., Kovacs T., Sajgo A., Szollosi J. Matyas S., Kaali S.G., 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
18. Krawetz SA. On the significance of RNA in human sperm. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2005a;11:170-174.
19. Lewis SE. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?. *Reproduction* 2007;134:31-40.
20. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S and Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012;9:e1001356.

21. McDowell S, Kroon B, Ford E, Hook Y, Glujovsky D and Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;10:CD010461
22. 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
23. Parmegiani L, Cognigni 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 Feb;93(2):598-604
24. Parmegiani L., Cognigni GE., Ciampaglia W., Pocognoli P., Marchi F., Filicori M., Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection *J Assist Reprod Genet.* 2010 Jan;27(1):13-6. doi: 10.1007/s10815-009-9380-0. Epub 2009 Dec 30
25. Parmegiani L., Cognigni G.E., Filicori M., New Advances in Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) GynePro Medical Centers, Reproductive Medicine Unit, Bologna. Italy 2012
26. Petersen C.G, Massaro F.C., Mauri N.L., Oliveira J., Baruffi R. RL, Franco J. G. Efficacy of hyaluronic acid binding assay in selecting motile spermatozoa with normal morphology at high magnification *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010, 8:149
27. Portella J., Sepulveda S., Evaluacion del Factor Masculino en Reproducción Asistida: Nuevas Tecnologías. *Rev. Per. Ginecol Obstet* 2011, 57:21-27
28. Saylan A., Duman S., Efficacy of Hyaluronic Acid in The Selection of Human Spermatozoa with Intact DNA by The Swim-up Method *Cell Journal (Yakhteh)*, Vol 18, No 1, Apr-Jun (Spring) 2016
29. Siverino-Bavio P., Una mirada desde la bioética jurídica a las cuestiones legales sobre la infertilidad en el Perú *Rev peru ginecol obstet.* 2012; 58: 213-219
30. Troya J., Manual de Procedimientos del Laboratorio de Andrología de la Clínica CEFRA. 2011-2016
31. 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.

32. Worrilow, K.C., Huynh, T., Bower, J.B., Anderson, A.R., Schillings, W., Crain, J.L. PICSI vs ICSI: statistically significant improvement in clinical outcomes in 240 in vitro fertilization (IVF) patients. *Fertil Steril.* 2007;88:s37
33. Worrilow K. C., Huynh H. T., Bower J. B., Peters A. J., Johnston J. B. The clinical impact associated with the use of PICSI derived embryos. *Fertility and Sterility* Vol. 86, Suppl 2, September 2006
34. 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; 31:566-57222.-
35. Ye H., Huang G., Gao Y., Liu DY. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization *Human Reproduction* Vol.21, No.6 pp. 1545–1550, 2006
36. 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.
37. Zini A., Boman J.M., Belzile E., Ciampi A., Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis *Human Reproduction* Vol.23, No.12 pp. 2663–2668, 2008

XI. ANEXOS

TABLA 1 BHCG Positivo ICSI vs PCSI

		Selección espermática				Total
		ICSI		PICI		
BHCG positivo	No	30	19.60%	8	23.53%	38
	Si	123	80.39%	26	76.47%	149
Total		153		34		187

TABLA 2 Embarazo clínico ICSI vs PICI

		Selección espermática				Total
		ICSI		PICI		
Embarazo clínico	No	39	25.49%	10	29.41%	50
	Si	114	74.50%	24	70.58%	137
Total		153		34		187

TABLA 3 Aborto ICSI vs PICI

		Selección espermática				Total
		ICSI		PICI		
Abortos	No	100	87.72%	20	83.40%	120
	Si	14	12.28%	4	16.60%	18
Total		114		24		138

TABLA 4. Estadísticas descriptivas de las diferencias entre medias y desviación estándar entre ICSI convencional y ICSI con Ácido Hialurónico, según variables.

VARIABLES	ICSI		PICSI		<i>p - value</i>
	<i>Media</i>	<i>SD</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>	
Edad DT (X)	22	3.38	23	4.8	0.119
Edad Receptora	41	4.49	42	3.04	0.084
Edad Varón (Y)	41.0	5.9	40.5	5.4	0.909
Volumen Seminal (mL)	2.0	1.4	2.5	1.13	0.242
Concentración SPZ (x million/mL)	44.0	34.3	47.0	35.4	0.940
Motilidad Espermática (%)	50.0	14.0	50.5	13.4	0.246
# Ovocitos inyectados	8.0	1.8	7.0	2.4	0.668
# Ovocitos fecundados	7.0	1.9	6.5	2.3	0.237
# Embriones de buena calidad	3.0	1.68	4.0	1.66	0.609
# embriones transferidos 5 día	2.0	0.3	2.0	0.3	0.957

TABLA 5. ICSI convencional versus ICSI - AH

Transferencia 5to día	ICSI	PICSI	<i>p - value</i>
Beta HCG positivo(%)	80.39%	76.47%	0.639
Embarazo Clínico (%)	74.50%	70.58%	0.401
Aborto (%)	12.28%	16.60%	1
Tasa de blastulación (%)	46.06%	44.63%	0.543

CARTA 1

Cefra

Centro de fertilidad
y reproducción asistida s.a.c.
Comprometidos con la vida

Carta de Consentimiento

Lima 12 de agosto del 2016

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académica Profesional de Biología
Presente.

Por medio de la presente otorgo a la Srita. María Alejandra Pérez Padilla identificada con DNI 70013642, laborando en nuestro centro desde el año 2012 a la fecha, la autorización para acceder a la base de datos del Centro de Fertilidad y Reproducción Asistida y así pueda hacer uso único y exclusivo para su tesis "Evaluación de la tasa de embarazo en pacientes de ovo donación sometidas a técnica a de ICSI convencional y selección espermática por ácido hialurónico".

Cabe mencionar que los datos brindados son estrictamente confidenciales. Sin otro particular y creyendo en el uso responsable de los datos, me despido.

Atte.


CENTRO DE FERTILIDAD Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Ricardo E. Palla Cáceres
Director de Laboratorio
Andrología y Embriología