

TESIS DOCTORAL DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA MEJORA EN LOS RESULTADOS
CLÍNICOS EN VARONES CON OLIGOSPERMIA SEVERA,
FALLOS DE ICSI Y ELEVADA FRAGMENTACIÓN DE ADN
MEDIANTE EL USO DE ESPERMATOZOIDES TESTICULARES**

Irene Hervás Herrero

Directores:

Dr. Nicolás Garrido Puchalt

Dra. Rocío Rivera Egea



VNIVERSITAT [Q~]
ID VALÈNCIA
Facultat de Ciències Biològiques

Valencia, Enero de 2024

*Indeed, it is [the spermatozoa] the only cell that has to leave the body to
undertake its function of fertilizing an oocyte within the female*
(Vallet-Buisan M, 2023)

**EVALUACIÓN DE LA MEJORA EN LOS RESULTADOS CLÍNICOS EN
VARONES CON OLIGOZOOSPERMIA SEVERA, FALLOS DE ICSI Y
ELEVADA FRAGMENTACIÓN DE ADN MEDIANTE EL USO DE
ESPERMATOZOIDES TESTICULARES**

EVALUATION OF IMPROVED CLINICAL OUTCOMES USING TESTICULAR
SPERMATOOA IN MALES WITH SEVERE OLIGOZOOSPERMIA, PREVIOUS ICSI
FAILURE AND HIGH DNA FRAGMENTATION

IRENE HERVÁS HERRERO

Directores de tesis: Dr. Nicolás Garrido Puchalt y Dra. Rocío Rivera Egea

Tesis doctoral

Programa Oficial de Doctorado 3102 en Biomedicina y Biotecnología

regulado por el Real Decreto 99/2011

Biotechnología de la reproducción humana asistida

Facultat de Ciències Biològiques



Valencia, Enero 2024

CERTIFICADO DIRECTORES

Don Nicolás Garrido Puchalt, doctor en Biología por la Universidad de Valencia.

Doña Rocío Rivera Egea, doctora en Biotecnología por la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado “*Evaluación de la mejora en los resultados clínicos en varones con oligozoospermia severa, fallos de ICSI y elevada fragmentación de ADN mediante el uso de espermatozoides testiculares*”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Irene Hervás Herrero, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología en la Universidad de Valencia.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 23 de enero de 2024

Fdo. Nicolás Garrido Puchalt

Dra. Rocío Rivera Egea

Esto queda ratificado por el tutor de la doctoranda, Dr. Juan Bautista Saus Mas, de la Universidad de Valencia.

25 de enero de 2024

Fdo. Juan Saus Mas

JUAN
BAUTIS
TA|
SAUS|
MAS

Firmado digitalmente por JUAN BAUTISTA SAUS MAS
Fecha: 2024.01.25 09:44:02 +01'00'

AGRADECIMIENTOS

Finalizo esta tesis dos días después de mi cumpleaños, y no podía tener mejor regalo para los veintinueve. Han sido años muy intensos a la par que divertidos, en los que se han mezclado risas, lágrimas, anécdotas y mucho aprendizaje, tanto a nivel profesional como humano.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis Nicolás Garrido y Rocío Rivera, por ser grandes consejeros y guías en este camino, y que han hecho posible que tenga esta tesis entre mis manos. Gracias por todo el aprendizaje y enriquecimiento personal. Gracias Nico por enseñarme a ser la profesional que soy hoy en día, sin ti no habría llegado a estar donde estoy y a saber todo lo que se. Gracias por confiar en mi para iniciar esta aventura y por todos los momentos vividos. Gracias Ro por aceptar ser también capitana de a bordo y acompañarme en todo momento con tus buenos consejos de veterana y saber hacer. Aparte, te has convertido en una gran amiga, tanto que me permitiste el lujo de ser dama de honor en tu boda, y con la que espero seguir compartiendo ratitos de café, paellas y excursiones gastronómicas por mucho tiempo.

No habría sido posible tampoco sin mis compañeras de equipo, de mesa y de zulito. Mery (my Queen), Anita, Laura (mi italiana favorita), y el último fichaje Rosa. Ellas son el Andro Team que nunca falla y siempre tienden una mano para ayudar, están en lo bueno y en lo no tan bueno, al pie del cañón. Tenemos miles de anécdotas juntas que guardo en mi corazón y ojalá poder seguir trabajando siempre juntas. No habrá karaoke que nos pare.

A mis padres y familia, que me habéis apoyado en todas las decisiones que tomaba y en los momentos más complicados, siempre habéis tenido palabras de apoyo y ánimos. A mi madre, que sabe lo que es pasar por esto, por darme la motivación para lograrlo y sus consejos. A mi padre, que nunca ha dejado que tirara la toalla y siempre me animaba a continuar. Porque abandonar tan fácilmente no era posible. A mis hermanos, Curre y Rach, por ser el equipo de tres en el que sobran las palabras y por estar ahí. Al resto de mi familia que entendió y me apoyó en esto de “hacer niños”. A la última incorporación, Miguel. No tengo palabras para decirte todo el bien que me haces y lo que agradezco que me enseñes a ver la parte positiva en los problemas que suceden. Eres mi piedra de toque. Gracias por comprenderme en todos los momentos de la maratón hasta llegar aquí. Os quiero.

Por otro lado, también agradecer a todas las personas que me han acompañado en este arduo camino de ser científica. A Lucía y Lorena, con las que pasé mis primeras horas investigando y escribiendo (aunque lo pasábamos mejor en las terracitas), a todos mis compañeros de Fundación IVI, que han sabido mostrar su apoyo en todo momento, Pepi, Antonio, Noe (Pearson), Marina, MC, Yassmin, Ismael, Rosalba, Adolfo, Alex, y Ángelillo, porque formamos una familia muy bonita en Valencia. A todos, gracias.

Además, no me puedo olvidar de las amigas que siempre han estado, Lucía y María Luisa, mi etapa allí sin vosotras no hubiera sido igual. Valencia nos ha regalado esta amistad desde que Lucía decidió invitar a ML una tarde a la playa (bendita idea). Desde entonces hemos sido inseparables. Por los miles de momentos vividos, en los buenos y en los malos, todas las risas y las lágrimas cuando algo no salía bien, por el apoyo constante en directo y ahora en la distancia. Os quiero mucho.

Por último, no menos importante, a mi gente italiana que me ha visto empezar a escribir esta tesis. Nuri, empezamos juntas en Valencia y quién nos iba a decir que íbamos a vivir en Roma y a vivir tantos momentos. Laureta, mi loca napoletana que da alegría allí por donde pasa y siempre tiene un momento para ayudar y comprender. Ágata y Marta, mis otros dos pilares de fortaleza. A mi querida amiga Livia, por seguir reencontrándonos y uniendo nuestros caminos alrededor de la ciencia y de la pizza. Alessandra, Pizzi, Vincenzo, Simona, Franco, Mauro, Save. Allí empecé a ser embrióloga de verdad.

A mis amigas de toda la vida, desde los tres años que estamos juntas y los que nos quedan por delante: Cris, Luci, Andrea, Lucí, Pilar, Sara, Natalia, Esther, Mónica, Cristina, Laura. Somos un gran equipo que ha sabido mantenerse. A Rodri, que siempre ha estado ahí, por nuestra amistad después de tanto y por saber estar, que no es fácil. Gracias por enseñarme y ayudarme en tantas cosas todos estos años (ahora los dos podemos decir que lo hemos conseguido!). A Elena, son muchos años compartidos.

A todos, gracias por los momentos compartidos hasta llegar aquí.

INDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	4
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS	11
INTRODUCCIÓN.....	14
La infertilidad	15
El espermatozoide y la infertilidad masculina	17
FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	24
Mecanismo de generación	25
Determinación del grado de FAE	28
Indicaciones clínicas para medir la FAE	33
Problemática actual en la determinación de la FAE	33
Impacto de la FAE en los resultados clínicos	35
Estrategias para disminuir el impacto de la FAE en los resultados reproductivos.....	43
USO DE ESPERMATOZOIDES TESTICULARES EN VARONES NO AZOOSPÉRMICOS	49
Uso de espermatozoides testiculares en varones con elevada FAE en el eyaculado	51
Uso de espermatozoides testiculares en varones con infertilidad masculina severa	56
Desventajas de la extracción quirúrgica de espermatozoides testiculares	59
HIPÓTESIS	62
OBJETIVOS	63
Objetivo principal	64
Objetivos secundarios.....	64
MATERIALES Y MÉTODOS	65
Estudio retrospectivo	66
Diseño de estudio.....	66
Población de estudio	66
Criterios de inclusión y exclusión.....	66
Resultados clínicos evaluados.....	67
Análisis estadístico	68
Estudio prospectivo	68

Diseño del estudio.....	68
Población de estudio	69
Criterios de inclusión y exclusión	69
Prueba de fragmentación del ADN espermático	70
Biopsia de testículo.....	72
Recogida de muestras de semen eyaculado y su análisis	72
Criopreservación de las muestras.....	74
Estimulación y punción ovárica.....	74
Capacitación muestras seminales.....	75
Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)	76
Desarrollo y evaluación de los embriones	76
Biopsia embrionaria para PGT-A	77
Transferencia embrionaria	77
FISH de espermatozoides	78
Análisis estadístico	78
Metaanálisis	79
Búsqueda bibliográfica	79
Criterios de elegibilidad y selección de estudios	79
Extracción de datos.....	79
Resultados clínicos evaluados.....	80
Análisis estadístico	80
RESULTADOS.....	81
Análisis retrospectivo	82
Estudio prospectivo	85
Análisis descriptivo de la población de estudio	85
Parámetros de calidad embrionaria	87
Análisis de aneuploidía espermática mediante FISH	88
Resultados clínicos	89
Metaanálisis.....	90
Descripción de los estudios incluidos	90
Fragmentación del ADN espermático.....	90

Resultados clínicos	92
DISCUSIÓN.....	97
Consideraciones finales	115
CONCLUSIONES	119
REFERENCIAS	122
ANEXO	153

RESUMEN

Hasta ahora, el uso de espermatozoides extraídos del testículo se limitaba a varones con azoospermia como único método para obtener descendencia biológica. Sin embargo, se ha propuesto su utilización como estrategia clínica para mejorar los resultados reproductivos en parejas con una elevada fragmentación del ADN en el eyaculado, con infertilidad masculina severa e incluso, cuando presentan ciclos previos de ICSI fallidos.

Diferentes estudios demuestran que la utilización de espermatozoides testiculares aumenta de forma significativa las tasas de embarazo y de nacidos vivos, al mismo tiempo que reduce la probabilidad de aborto. Una de las razones podría deberse al menor daño genómico de los espermatozoides testiculares en comparación con los del eyaculado que se ha demostrado tanto en modelos animales como en humanos. No obstante, se ha observado una mayor tasa de aneuploidías en los espermatozoides del testículo, sobre todo cuando existe mala calidad seminal.

Por el momento, ningún estudio publicado ha evaluado la ploidía de los embriones obtenidos en estas parejas, lo cual hace necesario explorar esta cuestión para asegurar la inocuidad de esta estrategia antes de su aplicación. Nosotros hipotetizamos que la mejora en los resultados reproductivos de los pacientes con elevada fragmentación del ADN y oligozoospermia severa viene de la mano de una mejora en la calidad de los embriones generados y un aumento en la proporción de embriones euploides, lo que se traduce en un mayor número de embriones disponibles para la pareja.

El presente trabajo de tesis doctoral trata de demostrar un aumento significativo del número de embriones cromosómicamente normales disponibles para transferir gracias al uso de espermatozoides testiculares en varones con una fragmentación del ADN en el eyaculado superior al 30%, con oligozoospermia severa y/o fallos de ICSI.

Para ello, se ha abordado esta cuestión a través de los siguientes objetivos secundarios: a) demostrar diferencias en el índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides procedentes del eyaculado y los testiculares; b) demostrar diferencias en los parámetros de calidad embrionaria entre los embriones procedentes de espermatozoides del eyaculado y los de biopsia testicular; c) evaluar la tasa de aneuploidías de los espermatozoides de eyaculado y los espermatozoides testiculares; y d) demostrar

diferencias en las distintas medidas de éxito reproductivo por transferencia embrionaria, con el uso de espermatozoides de eyaculado y de espermatozoides de biopsia testicular.

Gracias a la consecución de estos objetivos se ha demostrado que el cambio a espermatozoides testiculares con un grado de fragmentación del ADN menor para la ICSI resulta en una mayor proporción de blastocistos de buena calidad, aunque la tasa de euploidía embrionaria no difiere significativamente entre ambos tipos de espermatozoides. No obstante, ambos factores son cruciales para mejorar el éxito reproductivo de estas parejas.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AH	Ácido hialurónico
ARN	Ácido ribonucleico
ASEBIR	Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción
AUC	Área bajo la curva, del inglés <i>Area under the curve</i>
β-hCG	Hormona gonadotropina coriónica humana (subunidad beta)
CASA	Análisis de semen asistido por ordenador, del inglés <i>Computer-Assited Sperm Analysis</i>
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
Chd5	Proteína de unión a ADN de la helicasa de cromodominio 5
CMA3	Cromomicina A3
COC	Complejos cúmulo-ovocito
DET	Transferencia de dos embriones
DM	Diferencia de medias estandarizada
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E2	Estradiol
EO	Estrés oxidativo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESHRE	Congreso Europeo de Embriología Humana, del inglés <i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>
FAE	Fragmentación ADN espermático
FISH	Fluorescence in situ Hybridization
FIV	Fecundación In Vitro
FSH	Hormona folículoestimulante
GD	Gradientes de densidad
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
HAM	Hormona Antimulleriana
HMG	Gonadotropina menopáusica humana
H-NMR	Resonancia magnética nuclear de protones
HOS	Prueba hipoosmótica, del inglés <i>Hypo-osmotic Swelling</i>

IA	Inseminación Artificial
IC	Intervalo de confianza
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IMC	Índice de masa corporal
IMSI	Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides Seleccionados Morfológicamente, del inglés <i>Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection</i>
LC-MS/MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem
LH	Hormona luteinizante
MACS	Separación celular mediante campos magnéticos, del inglés <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MALDI-TOF MS	Espectrometría de masas de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz
MCI	Masa celular interna
MEA	Modelo de Efectos Aleatorios
MI	Metafase I
MII	Metafase II
NGS	Secuenciación de nueva generación, del inglés <i>Nex Generation Sequencing</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio
P4	Progesterona
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGT	Diagnóstico Genético Preimplantación
PICSI	ICSI fisiológico, del inglés <i>Physiological ICSI</i>
PLCz	Fosfolipasa C zeta
PRM1	Protamina 1
PRM2	Protamina 2
PVP	Polivinilpirrolidona
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RCT	Estudio controlado aleatorizado, del inglés <i>Ranzomized Controlled Trial</i>
RFA	Recuendo de Folículos Antrales
ROC	Característica Operativa del Receptor, del inglés <i>Receiver Operating Characteristic</i>
RR	Riesgo Relativo
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SCIT	Ensayo de la integridad de la cromatina espermática
SCD	Ensayo de dispersión de la cromatina espermática, del inglés <i>Sperm Chromatine Dispersion</i>
SCSA	Análisis de la estructura de la cromatina espermática, del inglés <i>Sperm Chromatine Structure Assay</i>
SET	Transferencia de un único embrión
SWOT	Análisis de Fortalezas, Debilidades, Oportunidades y Amenazas, del inglés <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats</i>
T4	Tiempo cinético en 4 células
T8	Tiempo cinético en 8 células
TE	Trofoectodermo
TESA	Aspiración de espermatozoides testiculares, del ingles <i>Testicular Sperm Aspiration</i>
TESE	Extracción de espermatozoides testiculares, del ingles <i>Testicular Sperm Extraction</i>
TP1	Proteína de Transición 1
TP2	Proteína de Transición 2
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida
TUNEL	Técnica Marcado final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa, del inglés <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP 7ick end labelling</i>
UI	Unidades Internacionales
VS	versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de daño que pueden ocurrir en el ADN.

Figura 2. Prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD) para evaluar la FAE en los espermatozoides (Halosperm® G2 de Halotech DNA, España).

Figura 3. Representación de la proporción de embriones según su calidad para cada grupo de estudio: T-ICSI y E-ICSI.

Figura 4. Representación de la proporción de embriones según su calidad para cada grupo de estudio: T-ICSI (n=10) y E-ICSI (n=11).

Figura 5. Representación de la proporción de embriones euploides, aneuploides y mosaico cada grupo de estudio: T-ICSI (n=10) y E-ICSI (n=11).

Figura 6. *Funnel plot* para escrutar la existencia de sesgo de publicación para el análisis del grado de FAE entre los espermatozoides testiculares y espermatozoides del eyaculado.

Figura 7. Gráfico en árbol o *forest plot* que representa la diferencia media (DM) para las tasas de FAE en los espermatozoides procedentes del testículo y los del eyaculado en varones con elevada FAE en el eyaculado que se realizaron un ciclo de ICSI. Se incluye un subanálisis en función de la técnica utilizada para medir la FAE.

Figura 8. *Funnel plot* de los estudios incluidos para el cálculo de la tasa de fecundación (A), tasa de gestación clínica (B), tasa de recién nacido vivo (C) y tasa de aborto (D).

Figura 9. Gráfico en árbol o *forest plot* que representa el odds ratio para la tasa de fecundación (A), tasa de gestación clínica (B), tasa de recién nacido vivo (C) y tasa de aborto (D) de los ciclos de ICSI en los que utilizaron espermatozoides procedentes del testículo o espermatozoides del eyaculado en varones con elevada FAE en el eyaculado con oligozoospermia o con fallos de ICSI previos.

Figura suplementaria 1. Esquema para la evaluación embriones in vitro según los criterios establecidos por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) en el segundo y tercer día del desarrollo embrionario.

Figura suplementaria 2. Esquema para la evaluación de embriones in vitro según los criterios establecidos por la asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) en el cuarto día del desarrollo embrionario.

Figura suplementaria 3. Esquema para la evaluación de embriones in vitro según los criterios establecidos por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) en el quinto día del desarrollo embrionario.

Figura suplementaria 4. Esquema del procedimiento de reclutamiento y planificación del ciclo de ICSI en el cual se microinyectaron los ovocitos de manera aleatorizada con espermatozoides testiculares (T-ICSI) y con espermatozoides del eyaculado (E-ICSI).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Origen de la infertilidad según causas y sexo (Modificado de Mélodie & Christine, 2018).

Tabla 2. Parámetros seminales establecidos en el último manual de la OMS 2021 (World Health Organization, 2021).

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los principales ensayos para medir la FAE en la práctica clínica (modificada de Dutta et al., 2020).

Tabla 4. Características demográficas y de la estimulación ovárica de la población en función del grupo de estudio E-ICSI o T-ICSI.

Tabla 5. Parámetros seminales de las muestras eyaculadas en fresco y tras la capacitación de los ciclos E-ICSI (n=27).

Tabla 6. Resultados clínicos de los ciclos de ICSI con espermatozoides eyaculados (E-ICSI) versus ICSI con espermatozoides testiculares (T-ICSI).

Tabla 7. Análisis descriptivo de la población de estudio (n=6).

Tabla 8. Parámetros seminales correspondientes a las muestras de espermatozoides del eyaculado y procedentes del testículo utilizadas para la ICSI.

Tabla 9. Resultados de laboratorio de los ciclos de ICSI con espermatozoides testiculares (T-ICSI) o del eyaculado (E-ICSI).

Tabla 10. Relación de los resultados del FISH de las muestras de espermatozoides del eyaculado y del testículo para cada varón incluido en el estudio.

Tabla 11. Resultados clínicos calculados por transferencia embrionaria según grupo de estudio al que pertenece el embrión seleccionado (T-ICSI o E-ICSI). Se realizó un total de 3 transferencias embrionarias por cada grupo.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad

La infertilidad según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se define como una enfermedad del sistema reproductivo femenino y/o masculino que consiste en la imposibilidad de conseguir un embarazo después de 12 meses de relaciones sexuales habituales sin protección. La infertilidad puede ser primaria, cuando no se consigue concebir un embarazo, o secundaria, si después de una gestación previa no se logra gestar (World Health Organization, 2023).

Actualmente, se calcula que alrededor de 48 millones de parejas en el mundo tienen problemas de fertilidad, y se considera que esta prevalencia tiene una tendencia al alza (Adamson GD et al., 2023). Entre un 25-30% de los casos, la infertilidad es ocasionada por factores femeninos, un 20-30% de las veces se debe a factores masculinos, y entre un 25-40% por problemas en ambos miembros de la pareja. Además, entre un 10-20% de las veces queda designada como de origen desconocido o idiopática. Las causas de la infertilidad son variadas, tal y como queda recogido en la siguiente Tabla 1 (Mélodie & Christine, 2018).

Tabla 1. Origen de la infertilidad según causas y sexo (Modificado de Mélodie & Christine, 2018).

En ambos sexos
- Hipogonadismo hipogonadotrófico
- Hiperprolactinemia
- Alteraciones en la función ciliar
- Fibrosis quística
- Infecciones
- Enfermedades sistémicas: diabetes, enfermedades autoinmunes, hipotiroidismo, etc.
- Estilo de vida: dieta, actividad física, estrés, obesidad, tabaquismo, alcohol, etc.
Factores femeninos
- Insuficiencia ovárica primaria
- Síndrome de ovario poliquístico (SOP)
- Endometriosis
- Fibromas uterinos
- Pólipos endometriales
Factores masculinos
- Deficiencias testiculares: enfermedades genéticas, criptorquidia, varicocele
- Deficiencias/alteraciones post-testiculares: disfunciones eyaculatorias

Para hacer frente a los problemas de fertilidad en los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas de diagnóstico y tratamientos. Desde el nacimiento del primer recién

nacido por fecundación in vitro (FIV) en 1978, y posteriormente con la aparición de la Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en 1992 (G. Palermo et al., 1992), cada año se registran más de 3 millones de ciclos de tratamientos de reproducción asistida (TRA) en todo el mundo (Adamson GD et al., 2023), obteniéndose alrededor de un millón de bebés nacidos por año.

Las TRA que se han desarrollado son la inseminación artificial (IA), la FIV, y la ICSI, siendo, respectivamente, procedimientos de menor a mayor complejidad técnica e invasividad. De manera resumida, la IA consiste en depositar mediante una cánula el semen procesado capacitado en el tracto reproductor femenino, generalmente en el útero. Esta puede ser con el semen de la pareja (IA Homóloga) o con semen de un donante (IA Donante). La técnica FIV consiste en obtener un número elevado de ovocitos tras la estimulación ovárica controlada y que tras la punción folicular se depositan en gotas de medio con espermatozoides previamente capacitados, simulando el proceso de fecundación. Posteriormente, los cigotos obtenidos se dejan en cultivo hasta obtener embriones aptos para su transferencia al útero. Por último, la ICSI consiste en microinyectar un espermatozoide previamente seleccionado por su motilidad y morfología en el citoplasma de un ovocito maduro mediante un microscopio micromanipulador. Tras la microinyección, el ovocito se deja en cultivo para continuar su desarrollo hasta el estadio embrionario apto para su transferencia al útero. En estas dos últimas técnicas, se pueden utilizar tanto gametos propios como donados en el caso de que uno o ambos miembros de la pareja no puedan hacer uso de sus propios gametos. Actualmente, la técnica más utilizada a nivel mundial es la ICSI (The European IVF Monitoring Consortium (EIM) et al., 2022).

Ante la creciente demanda, en los últimos 30 años el continuo desarrollo y el perfeccionamiento tecnológico de las TRA ha permitido que los casos más severos de infertilidad tanto masculina como femenina puedan conseguir descendencia. Fue especialmente destacable la invención de la ICSI para los casos más graves de infertilidad por factor masculino, ya que solo se requiere de un espermatozoide por ovocito para llevar a cabo la técnica y dar lugar a un embrión. Gracias a ella, varones diagnosticados con oligozoospermia severa, oligoastenoteratozoospermia, e incluso con azoospermia, pueden obtener descendencia biológica.

El espermatozoide y la infertilidad masculina

De manera general, los problemas de fertilidad se asocian más a factores femeninos que a factores masculinos, ya que la edad biológica de la mujer juega un papel determinante en las probabilidades de concepción natural que tiene la pareja. Sin embargo, no se debe olvidar el papel fundamental que presenta el espermatozoide en la concepción (Vallet-Buisan et al., 2023), ya que, como se ha comentado previamente, la infertilidad masculina afecta a un 20-30% de las parejas en edad reproductiva.

El espermatozoide es una célula que, pese a su pequeño tamaño, está altamente especializada y cumple muchas funciones esenciales más allá de ser el mero transportador del material genético paterno. Esta célula tiene que abandonar su ambiente fisiológico para adentrarse en el aparato reproductor femenino y viajar por él hasta encontrarse con el óvulo a través de un ambiente hostil. Una vez alcanza al ovocito en las trompas de Falopio, el espermatozoide tiene que haber sufrido el proceso de capacitación y reacción acrosómica para ser capaz de atravesar las células de la granulosa que protegen al óvulo y poder penetrar su membrana citoplasmática.

La capacitación es un proceso fisiológico que solo ocurre en los mamíferos mediante la cual el espermatozoide sufre cambios en su membrana y en sus componentes intracelulares haciéndolo hábil para nadar y adentrarse en el ovocito (Molina et al., 2018). De esta manera, solo el espermatozoide capacitado es capaz de fecundar un ovocito. En este proceso intervienen diversas moléculas, generalmente proteínas de membrana que a través de cascadas de señalización activan procesos celulares cruciales para iniciar la fecundación del ovocito y el posterior desarrollo embrionario. Entre estas moléculas encontramos IZUMO1, presente en la membrana ecuatorial del espermatozoide (Hirohashi & Yanagimachi, 2018; Inoue N et al., 2005), y que participa en la unión del espermatozoide a la membrana del ovocito mediante el receptor llamado JUNO (Bianchi et al., 2014). Una vez que se produce esta unión las membranas de ambos gametos son capaces de fusionarse y el espermatozoide se engulle por el citoplasma ovocitario. Otras moléculas que también podrían estar implicadas en la fecundación del ovocito portadas por el espermatozoide son la Galactina-3, CD151, TMEM95 y HE4, entre otras (Vallet-Buisan et al., 2023).

Pero no solo a través de la unión del espermatozoide a los receptores ovocitarios se produce la fecundación. Es necesaria además la activación del ovocito, y para ello se ha demostrado que es esencial la presencia de oleadas de calcio intracelular periódicas, que

activarían la maquinaria celular para la consecución de la segunda meiosis ovocitaria y la fusión de los gametos en uno solo núcleo o singamia. En este proceso también estaría implicada una molécula espermática que funcionaría como un factor de activación ovocitaria: la fosfolipasa C zeta (PLCz). Diversos estudios han demostrado que la ausencia parcial o total de esta molécula se asocia con una activación deficiente de los ovocitos (Kashir et al., 2011, 2018) y fallos de fecundación tras ICSI (Hachem et al., 2017; Nozawa et al., 2018).

Otra de las aportaciones cruciales del espermatozoide al desarrollo embrionario son los centriolos, orgánulos requeridos para las divisiones celulares, la formación y organización del citoesqueleto celular, y la formación y movimiento de cilios y flagelos. El espermatozoide humano contiene dos centriolos localizados en la zona del cuello: el centriolo proximal y el centriolo distal (Vallet-Buisan et al., 2023), al contrario que el ovocito, cuyos centriolos son eliminados durante la ovogénesis (Simerly et al., 2018). Por ello, es imprescindible que el espermatozoide aporte este orgánulo para dirigir las siguientes divisiones celulares que darán lugar a un embrión. Las alteraciones en esta estructura están relacionadas con bloqueo en el desarrollo embrionario y en una baja tasa de fecundación (Jaiswal et al., 2022).

Por otro lado, se encuentra la contribución de elementos moleculares como los transcritos de ácidos ribonucleicos (ARN) (codificantes y no codificantes), proteínas y modificaciones epigenéticas del genoma paterno que ayudan a la correcta expresión genética paterna y el desarrollo del embrión (de Castro et al., 2023). Aún se desconoce muchas de las funciones de los ARN, pero gracias al avance en la secuenciación de ácidos nucleicos se ha permitido detectar la presencia de estas moléculas en el espermatozoide y su función, no solo en durante la espermatogénesis y la protaminación del núcleo espermático, sino también en la fecundación y en el desarrollo embrionario temprano antes de la activación del genoma propio del embrión. Además, se han detectado diferentes proteínas espermáticas gracias a la espectrometría de masas, y aunque su papel queda aún por elucidar debido a la complejidad de su medición, se han relacionado con la fecundación y en el desarrollo embrionario pre-implantacional (Amaral et al., 2014; Castillo et al., 2018).

Asimismo, el núcleo paterno presenta una conformación especial denominada toroide que lo hace único. La cromatina espermática se encuentra en su mayoría altamente condensada por la presencia de unas nucleoproteínas especiales denominadas protaminas

en vez de las histonas que se encuentran en el resto de las células somáticas y en el ovocito, dejando un porcentaje pequeño de histonas con sus respectivas modificaciones epigenéticas que regulan la expresión génica (Gold et al., 2018). Esta conformación en forma de hipercompactación genera un menor acceso al ácido desoxiribonucleico (ADN) espermático y a su vez regula la expresión del genoma paterno durante la fecundación. Por ello, antes de su activación, se debe producir una reprogramación del núcleo que implica la descondensación de la cromatina y la sustitución de las protaminas por histonas, haciendo de nuevo accesible la cromatina paterna a la transcripción. Errores en alguno de los procesos de activación/desactivación de la cromatina paterna se relacionan con alteraciones en el desarrollo embrionario, baja calidad embrionaria, abortos, e incluso la aparición de enfermedades congénitas relacionadas con el *imprinting* (Vallet-Buisan et al., 2023). Por último, tampoco se puede olvidar el papel del plasma seminal que acompaña a los espermatozoides ya que tiene diversas propiedades para permitir la supervivencia y capacitación de los espermatozoides a lo largo de su recorrido. Contiene sustancias que ayudarían a preparar el endometrio y mejorar la anidación del embrión cuando este llegue al útero (Bromfield et al., 2014; Ibrahim et al., 2019).

Así pues, es muy importante la calidad del espermatozoide implicado en el proceso de fecundación porque está directamente relacionada con la viabilidad del embrión concebido y, por ende, el éxito del tratamiento. Actualmente, la evaluación de la calidad de la muestra seminal se realiza a través de parámetros cualitativos y cuantitativos siguiendo los criterios establecidos por la OMS (World Health Organization, 2021). Mediante los parámetros cualitativos (o macroscópicos) se evalúa el aspecto, color, consistencia y pH de la muestra de semen en fresco; con los parámetros cuantitativos (o microscópicos) se determina la concentración de espermatozoides, el número de espermatozoides móviles y su morfología y la vitalidad. Dependiendo de estos valores, se establecen categorías que indican la calidad de la muestra seminal (Tabla 2).

Sin embargo, el análisis básico del semen tiene una precisión limitada para determinar si el varón es fértil o infértil y un escaso valor predictivo del éxito reproductivo (Patel et al., 2018), ya que este análisis no es capaz de evaluar defectos intrínsecos del espermatozoide que pudieran dificultar su función. Los valores de referencia establecidos para cada parámetro seminal han evolucionado a lo largo de los años, pero estos han sido criticados por la variación biológica entre individuos y los diferentes grupos étnicos existentes y no tener en cuenta el factor femenino. De hecho, los parámetros de normalidad establecidos

en el último manual (World Health Organization, 2021) se considerarían anormales hace 20 años (Agarwal et al., 2021).

Tabla 2. Parámetros seminales establecidos en el último manual de la OMS 2021 (World Health Organization, 2021).

Parámetro	Límite de referencia	Nomenclatura
Volumen	$\geq 1,4$ ml	Hipospermia
Concentración	≥ 16 mill/ml	Oligozoospermia / Criptozoospermia / Azoospermia
Movilidad progresiva	$\geq 30\%$	Astenozoospermia
Movilidad total	$\geq 42\%$	Astenozoospermia
Morfología	$\geq 4\%$	Teratozoospermia
Vitalidad	> 58 vivos	Necrozoospermia
Leucocitos	< 1 mill	Leucospermia

Curiosamente, alrededor del 15% de los hombres tienen parámetros seminales dentro del intervalo de referencia normal y se diagnostican como infértiles (S. C. Esteves et al., 2014; Hamada et al., 2012). En consecuencia, diversos estudios han tratado de correlacionar la calidad de las muestras seminales con los resultados clínicos y el pronóstico reproductivo, pero todos han fallado en encontrar el parámetro que mejor prediga la probabilidad de embarazo. Un antiguo estudio (Ombelet et al., 1997) demostró la falta de predicción de los parámetros seminales, tanto únicos y como combinados entre ellos, para diferenciar hombres fértiles de los subfértiles mediante las curvas ROC (Característica Operativa del Receptor). La morfología fue el parámetro que obtuvo la puntuación predictiva más alta (78%) con un valor de corte del 10%, pero resaltaron que es importante utilizar una combinación de parámetros espermáticos para predecir más adecuadamente el estado de fertilidad de un hombre.

Además, el análisis del semen convencional es un método altamente subjetivo y carece de estandarización por ser manual y operador-dependiente (Filimberti et al., 2013; Mallidis et al., 2012), junto con la gran variabilidad que presentan las muestras seminales de un mismo sujeto en el tiempo como para poder establecer un diagnóstico definitivo. Debido a ello, en los últimos años se han desarrollado pruebas analíticas complementarias al análisis básico del semen que permitan obtener más información sobre la calidad de la muestra seminal y la funcionalidad del espermatozoide para un diagnóstico más acertado del origen de la infertilidad masculina.

- Análisis CASA

El análisis CASA (el acrónimo de *Computer-Assited Sperm Analysis* o Análisis de semen asistido por ordenador) es una evaluación más específica y profunda de la célula espermática mediante un sistema computacional. Este sistema informático se basa en la captura de imágenes mediante un microscopio óptico en forma de fotogramas, que son digitalizados y posteriormente analizados mediante algoritmos específicos. Fueron introducidos en el laboratorio hace más de 30 años con el objetivo de reducir la subjetividad presente en el análisis básico del semen y la variabilidad intra- e inter-observador (Mortimer, 2000).

Actualmente, los sistemas CASA son semiautomáticos o están totalmente automatizados con diferentes algoritmos. De forma general, estos sistemas son capaces de evaluar la cinemática y motilidad espermática, la concentración, la cantidad de espermatozoides móviles progresivos, la vitalidad, e incluso la fragmentación del ADN espermático (Dearing et al., 2021). La alta precisión y el análisis detallado de los parámetros cinemáticos (velocidad de movimiento, relaciones de velocidad y bateo) de los espermatozoides son las dos principales ventajas de CASA sobre los métodos manuales, que permite una categorización más detallada de la muestra seminal sin los sesgos de la observación inter-personal (Baskaran et al., 2021).

Los sistemas CASA presentan como ventaja que son métodos automáticos de medición de un gran número de muestras, incrementa la reproducibilidad del análisis, disminuye la subjetividad del intra- e inter-operador, y permite la valoración de características morfológicas y cinéticas que un ojo humano mediante un microscopio óptico no puede detectar (Dearing et al., 2021). Sin embargo, también presenta desventajas y limitaciones como la necesidad de un equipamiento caro y personal entrenado, su precisión de análisis disminuye cuando la concentración de la muestra no está dentro del rango óptimo del equipo (entre 2-50 millones/ml de espermatozoides) y que características inherentes de las muestras seminales pueden entorpecer el análisis automático, como una hiperviscosidad, presencia de células redondas, debris celular y aglutinación espermática. Además, los resultados de los distintos instrumentos no son comparables debido a la falta de normalización de los sistemas CASA.

- Test de vitalidad

Las pruebas de vitalidad tienen el objetivo de diferenciar los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos inmóviles en muestras que presentan una baja motilidad progresiva (recomendado en muestras con menos del 40% de motilidad). Se basan en la

permeabilidad de las membranas celulares a diferentes compuestos según la integridad que presenten. Existen dos métodos para evaluar la vitalidad espermática.

Uno de ellos es la tinción eosina-nigrosina, que se basa en el principio de que las membranas plasmáticas dañadas, como ocurre en toda célula muerta, permiten la entrada de tinciones impermeables al interior celular, mientras que los espermatozoides vitales excluyen la tinción y permanecen sin colorear. Para realizarla, una muestra espermática se mezcla con un mismo volumen de solución eosina-nigrosina y se visualiza en un portaobjetos a un aumento de 1000X. Los espermatozoides muertos aparecen con un color rosa claro-oscuro mientras que los espermatozoides vivos aparecen blancos, sin colorear, sobre un fondo coloreado. Para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos se cuentan sobre 200 células el número de espermatozoides teñidos (muertos) y no teñidos (vivos).

La otra prueba que se utiliza para evaluar la viabilidad espermática es el test hipoosmótico (HOS, *Hypo-osmotic Swelling*). Se fundamenta en que solo las células viables con la membrana plasmática intacta y funcionales a la permeabilidad pueden hincharse en condiciones hipoosmóticas. De esta manera, se diferencian los espermatozoides vivos de los muertos en base a la hinchazón del flagelo cuando estos son incubados en soluciones hipoosmóticas (Baskaran et al., 2021).

La solución utilizada para ello es una mezcla de citrato de sodio dihidratado con D-fructosa en agua pura. Una alícuota de muestra seminal se mezcla con la solución hipoosmótica durante 30 minutos (en el caso de una prueba diagnóstica) o 5 minutos (si los espermatozoides van a ser procesados para la técnica de reproducción asistida) a 37°C, y posteriormente se visualiza al microscopio óptico a 200X o 400X. Se evalúan un total de 200 espermatozoides para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos, que se identifican por el enrollamiento de su flagelo y su engrosamiento (Baskaran et al., 2021).

- Ciencias ómicas.

Las ciencias ómicas son una parte de la biología molecular encargada de estudiar el conjunto e interacciones de miles de moléculas dentro de una célula u organismo. En referencia al espermatozoide, son cada vez más los estudios dedicados a encontrar estas moléculas, como proteínas (proteómica), ARN (transcriptómica) y metabolitos

(metabolómica), que ayuden a identificar y diagnosticar las causas de la infertilidad masculina, y que, además, sirvan como biomarcadores.

Cada vez está siendo más estudiada la transcriptómica del espermatozoide debido a que esta célula es transportadora de ARNs esenciales para el posterior desarrollo embrionario (Garrido et al., 2008, 2013). El estudio de los ARN (codificantes y no codificantes) revela la expresión génica de las células espermáticas, con la posibilidad de crear diferentes perfiles de expresión según la condición de fertilidad/infertilidad del varón (Egea et al., 2014). Por ello, gracias a técnicas como los microarrays y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y/o reversa (RT-PCR) se han identificado diferentes transcritos expresados de manera diferencial entre donantes fértiles y varones infértiles y entre pacientes que consiguen embarazo y aquellos que no tras la aplicación de las TRA (García-Herrero et al., 2011). Estudios moleculares más recientes han definido la presencia de ciertos microRNAs como biomarcadores de infertilidad idiopática como predictores del éxito de la ICSI (Llavanera et al., 2022).

En el caso de la metabolómica, se estudian metabolitos asociados a estados fisiológicos o patológicos (Egea et al., 2014). Para ello, se evalúa tanto substratos del plasma seminal como de las células espermáticas mediante técnicas quimioluminiscentes o más complejas y específicas como MALDI-TOF MS (espectrometría de masas (MS) de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz) y H-NMR (resonancia magnética nuclear de protones) (Llavanera et al., 2022; Rivera-Egea et al., 2018^a). Entre los compuestos examinados se encuentran todos aquellos relacionados con el estrés oxidativo y procesos inflamatorios (varicocele, prostatitis), o moléculas lipídicas relacionadas con la probabilidad de embarazo tras ICSI (Rivera-Egea et al., 2018^b) o como diagnósticas de la condición de infertilidad (Tang et al., 2017).

En cambio, la proteómica evalúa el conjunto de proteínas presentes en un momento dado como resultado de la expresión génica. Existen numerosas técnicas complejas y sensibles capaces de realizar un análisis de proteínas espermáticas (como el ensayo inmunoenzimático, LC-MS/MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem), Western blot y citometría de flujo). Diferentes estudios han señalado proteínas que podrían ser utilizadas como biomarcadores de calidad espermática, funcionalidad y capacidad fecundante, presentes tanto en el plasma seminal como en la misma célula espermática (Llavanera et al., 2022; Martinez-Soto et al., 2018).

- Fragmentación del ADN espermático

La fragmentación del ADN del espermatozoide, en adelante FAE, consiste en la presencia de roturas en la cadena de ADN, pudiendo ser en una o en ambas hebras. El origen de estas roturas puede ocurrir tanto a nivel testicular como a nivel post-testicular, es decir, a lo largo del recorrido que realizan los espermatozoides tras su salida del testículo.

La causa de la FAE depende de numerosos factores; algunos de ellos son extrínsecos (tabaquismo, consumo de sustancias tóxicas, quimioterapéuticos, exposición al calor, contaminación) y otros intrínsecos (relacionados con procesos madurativos incompletos, apoptosis abortiva, estrés oxidativo (EO), infecciones y enfermedades). De todos ellos, el que más impacto tiene sobre la aparición de FAE es el estrés oxidativo por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) (O_2 , H_2O_2 , OH , etc.) en el ambiente espermático (Agarwal et al., 2014; Panner Selvam et al., 2020). De forma natural, ciertos niveles de estas sustancias son vitales para procesos fisiológicos como la apoptosis y la capacitación espermáticas para lograr la fecundación, pero una sobreproducción conlleva un efecto deletéreo sobre la homeostasis espermática pudiendo perjudicar la integridad del ADN.

Existen diferentes pruebas capaces de cuantificar el número de espermatozoides que presentan fragmentación de la cromatina en relación con el total de espermatozoides de la muestra analizados. Las principales pruebas analíticas clínicas para medirla son las siguientes: SCSA (*Sperm Chromatine Structure Assay*), ensayo Cometa alcalino, SCD (*Sperm Chromatine Dispersion*) y TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labelling*) (Dutta et al., 2020; S. C. Esteves et al., 2020). Sin embargo, pese a la gran variedad de ensayos para su medición, existe una falta de estandarización de los protocolos y un valor de referencia o punto de corte a partir del cual establecer un bajo potencial fértil masculino.

FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

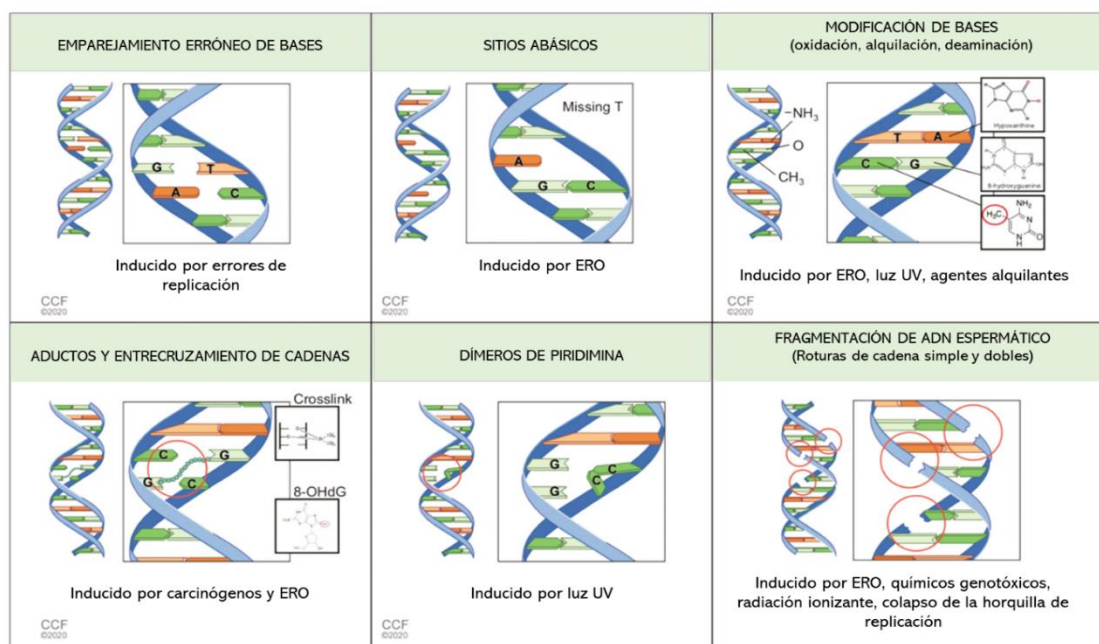
Como se ha expuesto anteriormente, la FAE se define como rupturas en una o en ambas hebras del ADN del espermatozoide que puede ocurrir en mayor o en menor magnitud a lo largo de toda la cadena, y que pueden afectar a la funcionalidad del espermatozoide. Es un tema ampliamente estudiado debido a su posible implicación reproductiva.

Mecanismo de generación

Tanto factores extrínsecos como intrínsecos pueden favorecer las rupturas en la cadena del ADN del espermatozoide. Entre los factores extrínsecos encontramos sustancias contaminantes (tabaco), radiaciones, una mala alimentación, diferentes tipos de medicamentos, infecciones testiculares o sistémicas, largos periodos de abstinencia y la presencia de varicocele. Como factores intrínsecos se encuentran relacionados una maduración de las células germinales defectuosa, la apoptosis fallida o abortiva y el estrés oxidativo (Agarwal, Majzoub, et al., 2020).

Se ha establecido que las ERO contribuyen en gran medida a la infertilidad masculina (Agarwal et al., 2006), y aunque son necesarias para diferentes procesos fisiológicos que debe sufrir el espermatozoide para cumplir su función, como la capacitación y la apoptosis, tienen un efecto deletéreo cuando se presentan en niveles elevados o existe un desbalance con los niveles de antioxidantes (J. A. Lee et al., 2019; Sharma et al., 2015), con consecuencias perjudiciales para el gameto masculino. Los tipos de daños que el ADN puede sufrir incluyen el emparejamiento erróneo de bases, la pérdida de bases (sitio abásico), las modificaciones de bases, los aductos y enlaces cruzados del ADN, los dímeros de pirimidina y las roturas de cadena simple y doble (Agarwal, Majzoub, et al., 2020) (Figura 1).

Figura 1. Tipos de daño que pueden ocurrir en el ADN (Imagen modificada de Agarwal et al 2020).



ERO: especies reactivas de oxígeno; UV: ultravioleta.

La sensibilidad que presenta el espermatozoide a las ERO es debido a la conformación especial de su cromatina, diferente al resto de las células somáticas. En todas las células del cuerpo humano, la cromatina se une a unas proteínas especiales denominadas histonas, que se conforman de manera especial formando los nucleosomas. Estos nucleosomas están formados por algo menos de dos vueltas de ADN alrededor de un conjunto de ocho histonas (Xu & Zhu, 2010). Estas histonas pueden sufrir modificaciones postraduccionales (acetilación, metilación, fosforilación, etc.) como mecanismo de control de la expresión génica y el acceso a la transcripción de los genes (Bartosovic et al., 2021). Sin embargo, durante la espermiogénesis la mayoría de estas histonas son sustituidas por otro tipo de proteínas nucleares denominadas protaminas, por lo que cada nucleosoma inicial se tiene que desensamblar para que las protaminas se unan a la hebra de ADN, conformando una estructura en bucle especializada muy compacta denominada toroide (Derouchey et al., 2013; Steven Ward et al., 1991). Esta estructura toroidal es fundamental en la formación del espermatozoide (W. Li et al., 2014).

Los pasos clave de la remodelación de la cromatina comienzan con la sustitución de las histonas por variantes histónicas, seguida de la hiperacetilación, la rotura y reparación de las cadenas transitorias de ADN, la sustitución por proteínas de transición y, por último, la sustitución por protaminas (Hao et al., 2019). La sustitución de las histonas por sus variantes de histonas se activa por la acetilación, una modificación epigenética que desemboca en la relajación y distensión de la estructura de la cromatina. De todas ellas, la variante de la proteína histona 2B es la más común en espermatozoides maduros y se caracteriza por su localización en los telómeros de los cromosomas espermáticos y la falta de poliadenilación en el terminal 3'. Por otro lado, se piensa que las modificaciones postraduccionales de los residuos de histonas, en particular la hiperacetilación de la histona H4, facilitan la acción de la topoisomerasa que conduce a la eliminación de las histonas mediante la apertura de la cromatina (Moretti et al., 2017). La topoisomerasa II induce específicamente las roturas de la cadena de ADN que permiten la sustitución de las histonas por proteínas de transición (Güneş & Kulaç, 2013). Estas roturas transitorias de la cadena de ADN son necesarias tras la retirada de las histonas con el fin de eliminar los superenrollamientos de ADN libres para permitir el empaquetamiento del ADN protamínico en el espermatozoide maduro (Hao et al., 2019). Una vez finalizada la actividad de la topoisomerasa II, la proteína de transición 1 (TP1) y la proteína de transición 2 (TP2) proceden a reemplazar las variantes de histonas. La TP1 podría

funcionar como una proteína de fusión del ADN que interviene en la eliminación de histonas, mientras que la TP2 desempeñaría su papel en la condensación de la cromatina con la adición de las protaminas. Las protaminas 1 y 2 (PRM1 y PRM2) son las que se encuentran en humanos, y proporcionan estabilidad a la cromatina espermática con su ensamblaje en el surco menor además de estimular la formación toroidal en el empaquetamiento de la cromatina (Hao et al., 2019). Todas estas proteínas que actúan desde el nivel de histonas hasta las protaminas vienen reguladas a su vez por una proteína reguladora denominada proteína de unión a ADN de la helicasa de cromodominio 5 (Chd5) (W. Li et al., 2014; Zhuang et al., 2014).

Todos estos pasos necesitan ser realizados de manera coordinada y en los tiempos adecuados para que la doble hebra de ADN quede bien protegida dentro del núcleo del espermatozoide. En el momento en que uno de los pasos anteriores se altere o se realice de forma deficiente, la cadena de ADN queda expuesta y se predispone daños en forma de roturas y mutaciones. Más específicamente, en el caso de la maduración defectuosa, las roturas de ADN que se producen durante la sustitución de las histonas para aliviar la tensión torsional no son reparadas de nuevo por la topoisomerasa II tras su acción, quedando las hebras abiertas al exterior (Tamburrino et al., 2012) y originando espermatozoides con el ADN fragmentado en el eyaculado.

En el caso de la FAE producida por una apoptosis fallida durante la espermatogénesis, se encuentran espermatozoides con marcadores apoptóticos en el semen eyaculado debido a que estas células escapan de la apoptosis iniciada por un defecto intrínseco propio y no son eliminadas (Agarwal, Majzoub, et al., 2020; Kuchakulla et al., 2021; Shukla et al., 2012). La apoptosis garantiza que ninguna célula germinal defectuosa se diferencie en espermatozoides; sin embargo, el fracaso de este proceso puede dar lugar a la acumulación de espermatozoides que expresan la ruta Fas-FasL activa y las caspasas 8 o 10, lo que da lugar a una mala calidad espermática (Muratori et al., 2015; Sharma et al., 2015). La apoptosis abortiva durante la meiosis I es uno de los principales mecanismos relacionados con la presencia de daños en el ADN espermático, ya que son células que estaban destinadas a su eliminación y la integridad de su material genético puede estar comprometida.

En el caso del ataque directo por ERO, las bases del ADN sufren modificaciones y transformaciones; la más común es la formación del aducto 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en áreas donde la hebra no está bien unida a las protaminas

(Gawecka et al., 2015). De hecho, se ha encontrado una alta correlación entre el nivel de 8-OHdG (principal marcador del estrés oxidativo del ADN) y la FAE (Tamburrino et al., 2012). Además, se ha descubierto que el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), la especie más reactiva, induce potencialmente daños en el ADN de doble cadena en el espermatozoide a través de la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas (González-Marín et al., 2012; Kuchakulla et al., 2018). Además, la FAE puede ser inducida indirectamente por los subproductos de la peroxidación lipídica (como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4HNE)), que pueden introducir aductos en algunas bases, como la 8-OHdG, la 1,N6-etenoadenosina y la 1,N6-etenoguanosina, dando lugar a daños en el ADN (Aitken et al., 2013; Moazamian et al., 2015).

Determinación del grado de FAE

Existen dos aproximaciones para evaluar el grado de daño en la cromatina paterna; una de ellas mide directamente el nivel de fragmentación del ADN mediante el uso de sondas y tintes, mientras que la otra mide la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización, que es más común en el ADN fragmentado (Majzoub et al., 2016; Shamsi et al., 2011). En la actualidad, se han desarrollado hasta ocho ensayos diferentes para medir la FAE, siendo los más comunes en clínica el ensayo TUNEL, el test SCD y el test SCSA. Estos son los siguientes:

- ❖ Ensayos que miden mediante el uso de sondas/tintes.

- Ensayo TUNEL

Este ensayo detecta los “huecos” en el ADN que dejan las roturas utilizando nucleótidos fluorescentes (dUTP). Para ello, se cuantifica la incorporación de los nucleótidos en los extremos 3'-OH libres localizados en las roturas, tanto en las de cadena simple como en las dobles, mediante una reacción enzimática. Esto crea una señal fluorescente que aumenta en función del número de roturas que presente el ADN (Sakkas & Alvarez, 2010) y se detecta mediante citometría de flujo o microscopio de fluorescencia. Es un ensayo directo, rápido y robusto que cuantifica conjuntamente las roturas únicas y de cadena doble de las hebras de ADN, sin diferenciarlas, en un conjunto de 10.000 espermatozoides (Sharma et al., 2020). Recientemente, para mejorar la medición de la técnica, se usa de ditiotreitól (DTT) antes de la fijación de la muestra, con el objetivo de permitir el acceso a todos los *nicks* por la sonda (Mitchell et al., 2011; Shamsi et al., 2011).

Aunque muchos consideran que el TUNEL es la técnica gold standard para el análisis de FAE (Sakkas & Alvarez, 2010), actualmente sigue faltando un protocolo común estandarizado y la elección de un valor de referencia, lo que dificulta la comparación entre laboratorios (Feijó & Esteves, 2014). Además, requiere la utilización de un citómetro o microscopio de fluorescencia, un equipamiento costoso que impide su uso generalizado.

- Ensayo naranja de acridina

El naranja de acridina es un colorante fluorescente catiónico selectivo de ácidos nucleicos que interactúa con el ADN de doble cadena o de cadena simple por intercalación o atracción electrostática, respectivamente. Cuando se une al ADN de doble cadena, tiene un máximo de excitación a 502 nm y un máximo de emisión a 525 nm (verde). Sin embargo, cuando se asocia con ADN de cadena simple, el máximo de excitación se desplaza a 460 nm (azul) y el máximo de emisión se desplaza a 650 nm (rojo). Este cambio en el espectro de emisión permite determinar el grado de daño en la cromatina de los espermatozoides. Tras la desnaturalización del ADN espermático con ácido suave, el naranja de acridina se une o al ADN de doble cadena (es decir, no desnaturalizado) produciendo fluorescencia verde o al ADN de cadena simple (es decir, desnaturalizado) produciendo fluorescencia roja. El número de células rojas que se cuantifiquen es el número de espermatozoides con daños en el ADN de la muestra (Agarwal, Majzoub, et al., 2016).

Esta técnica es rápida, sencilla y barata. Sin embargo, la presencia de tinciones heterogéneas en el portaobjetos con múltiples colores intermedios, variaciones en la técnica entre laboratorios y la falta de reproducibilidad de la prueba hacen que este ensayo sea una prueba poco fiable de la FAE (Chohan et al., 2006; Shamsi et al., 2011).

- Tinción con azul de anilina

El azul de anilina es un colorante ácido que tiene una gran afinidad por las histonas ricas en lisina del núcleo de los espermatozoides inmaduros, lo que provoca que se tiñan de azul. En cambio, los núcleos ricos en protaminas de los espermatozoides maduros tienen abundante arginina y cisteína y reaccionan negativamente, permaneciendo sin teñir. El aumento de la tinción de color azul de los espermatozoides sobre el portaobjetos indica un empaquetamiento débil de la cromatina y más expuesto a daños en el ADN (AUGER et al., 1990). Se trata de una técnica sencilla y barata que requiere de un microscopio de

campo claro para su análisis, pero la tinción heterogénea de los portaobjetos sigue siendo una desventaja de esta técnica (Agarwal, Majzoub, et al., 2016).

- Tinción azul de toluidina

El azul de toluidina es un colorante básico tiazínico metacromático con gran afinidad por los residuos de fosfato del ADN espermático. Para ello utiliza la fijación de la muestra con acetona y etanol (1:1) sobre un portaobjetos, seguido de una hidrólisis con ácido clorhídrico. La tinción de azul de toluidina se incubaba sobre el portaobjetos para acabar lavándolo con agua destilada, butanol y xileno. Se observa directamente al microscopio óptico, pudiendo diferenciarse las cabezas de espermatozoides con una integridad del ADN normal de color azul claro, mientras que las cabezas de espermatozoides con ADN dañado se tiñen de violeta. Es una técnica rápida, barata y sencilla de ejecutar, aunque presenta una alta variabilidad inter-observador (Dutta et al., 2020).

- Tinción con cromomicina A3 (CMA3)

CMA3 es un glucósido de antraquinona producido por una cepa específica de la bacteria *Streptomyces griseus* que en presencia de Mg^{2+} se une al ADN, donde compete específicamente por los sitios de unión de la protamina a través del surco menor del ADN (tiene afinidad por los residuos guanina-citosina), indicando así la deficiencia de protamina. Por lo tanto, cuando la prueba es altamente positiva, refleja indirectamente un estado de baja protaminación del ADN asociado a una cromatina espermática mal empaquetada (Manicardi et al., 1995). Para realizar este ensayo es necesaria la presencia de un microscopio de fluorescencia, y lo que se observa es aquellos espermatozoides deficientes en protamina aparecen de color amarillo brillante mientras que los espermatozoides con una protaminación normal aparecen de color verde amarillento. La principal limitación de este ensayo reside en la subjetividad entre observadores y en el hecho de que sólo puede evaluarse un número relativamente pequeño de espermatozoides (Dutta et al., 2020).

- Ensayo Cometa

El ensayo cometa aplica principios básicos de permeabilidad y movimiento electroforético del ADN fragmentado. El nombre del ensayo procede del dibujo que deja el espermatozoide con el ADN fragmentado, como una estela que sale de la cabeza del espermatozoide semejando una cola de "cometa", por lo que es posible cuantificar la

cantidad de ADN dañado por espermatozoide. La intensidad de la tinción y la longitud de la cola de cometa representan la cantidad de ADN migrado, lo que indica diferentes grados de fragmentación (Singh et al., 1988), mientras que el espermatozoide con el ADN intacto permanece en la cabeza del cometa (Dutta et al., 2020).

Mediante este ensayo es posible detectar ambos tipos de roturas, de cadena simple y de cadena doble en una sola célula a través de una electroforesis neutra o alcalina, respectivamente. Además, es capaz de identificar bases alteradas. Sin embargo, este método no es adecuado para el diagnóstico rápido y requiere personal altamente especializado para analizar los resultados. Una gran ventaja que presenta es que puede utilizarse en pacientes con oligozoospermia grave, ya que sólo se necesitan unos 5.000 espermatozoides por análisis para obtener un resultado fiable (Agarwal, Majzoub, et al., 2016; Lewis et al., 2013).

❖ Ensayos que miden la susceptibilidad a la desnaturalización:

- Ensayo SCD (Sperm Chromatin Dispersion)

El test SCD o de la dispersión de la cromatina espermática, también conocida como prueba del halo (Fernández et al., 2003), se basa en que tras la desnaturalización ácida y la eliminación de las proteínas nucleolares del espermatozoide se produce un halo de dispersión del ADN alrededor de la cabeza de los espermatozoides sin cromatina fragmentada, mientras que aquellas células con el ADN fragmentado no producen este halo característico, presentando la cabeza intacta. La eliminación de los componentes protectores de la cromatina espermática expone las zonas enteras y fragmentadas del ADN, permitiendo que el genoma entero forme loops o halos alrededor del núcleo del gameto (Dutta et al., 2020).

Los halos pueden observarse al microscopio óptico de campo claro si la muestra se procesa con una solución de Wright o si se utilizan fluorocromos dirigidos al ADN (como el EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético)), se puede observar al microscopio de fluorescencia. La técnica es sencilla de realizar, rápida y no requiere de instrumentación compleja. No obstante, carece de cierta objetividad entre observadores a la hora de definir y categorizar los halos.

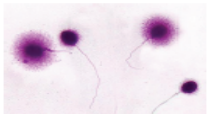
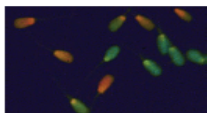
- Test SCSA

El SCSA (del inglés Sperm Chromatin Structure Assay) o ensayo de la estructura de la cromatina del espermatozoide mide la susceptibilidad del ADN espermático a la desnaturalización cuando se expone al calor o a los ácidos. Este ensayo utiliza citometría de flujo para evaluar grandes cantidades de células (10.000 espermatozoides) de forma rápida y robusta (Lewis et al., 2013). El grado de desnaturalización del ADN se determina midiendo el cambio de la fluorescencia verde cuando el ADN se encuentra íntegro a la fluorescencia roja que representa un ADN con roturas (Bungum et al., 2012).

Aunque es un ensayo con un protocolo estandarizado para todos los usuarios, lo que minimiza la variación entre laboratorios, requiere del uso de un citómetro de flujo y de personal cualificado para realizarlo (Dutta et al., 2020).

En la práctica clínica, las pruebas más utilizadas son el SCD, el ensayo TUNEL y el SCSA, por su facilidad de ejecución y coste a la hora de realizar numerosas medidas de FAE. Cada uno de estos ensayos tiene sus ventajas y desventajas en cuanto a practicidad en la medición, coste y tiempo requerido para ejecutarlo (Tabla 2). Pero, pese a ser una prueba común en los laboratorios de infertilidad masculina, su gran limitación es la falta de estandarización en los protocolos utilizados y la falta de criterio para establecer un punto de corte que defina un valor de daño perjudicial que comprometa la fertilidad masculina.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los principales ensayos para medir la FAE en la práctica clínica (modificada de Dutta et al., 2020).

Ensayo		Ventajas	Desventajas
SCD		Simple de realizar	Alta variación inter-observador
Ensayo TUNEL		Sensible, fiable y con una variabilidad inter-observador mínima. Puede realizarse con pocos espermatozoides	Requiere estandarización del protocolo entre laboratorios
SCSA		Estimación fiable del porcentaje de espermatozoides con ADN dañado	Requiere un observador experimentado. Variabilidad inter-observador

SCD: Sperm chromatin dispersion test; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labelling assay; SCSA: Sperm chromatin structure assay.

Indicaciones clínicas para medir la FAE

Actualmente, existen diferentes escenarios clínicos según la Sociedad de Medicina Traslacional (Agarwal et al., 2017; Agarwal, Majzoub, et al., 2020) en los que se recomienda medir la FAE de los varones que acuden a un centro de reproducción asistida a realizarse un tratamiento:

- Diagnóstico de varicocele.
- Abortos recurrentes.
- Infertilidad de origen desconocido.
- Pacientes expuestos a tóxicos, contaminantes, procesos inflamatorios locales o sistémicos, o malos hábitos de vida.

Problemática actual en la determinación de la FAE

Pese a disponer de una gran variedad de ensayos para evaluar la integridad del ADN del espermatozoide, la falta de estandarización de los protocolos y guías es una de las principales limitaciones actuales (S. C. Esteves, Agarwal, et al., 2017), causa de que no exista un acuerdo internacional sobre cual técnica es la más idónea y/o preferible. Esto desemboca en una alta variabilidad en las mediciones entre laboratorios y entre el personal que realiza la técnica, lo que restringe la comparación de los resultados obtenidos. Además, otro punto que debe considerarse que impide la comparación entre los diferentes ensayos es el modo en la que la integridad del ADN se mide para determinar el porcentaje de roturas, ya que algunos métodos cuantifican directamente las roturas, como el TUNEL o el ensayo cometa, mientras que otros lo miden indirectamente a través del grado de desnaturalización de la cromatina (como el SCD o SCSA). Debido a estas diferencias, es difícil correlacionar los resultados clínicos con los diferentes ensayos (S. C. Esteves et al., 2014).

Por otro lado, tampoco existe un acuerdo internacional sobre el valor de referencia a partir del cual establecer una reducción del potencial fértil del espermatozoide y en consecuencia malos resultados reproductivos. Evenson y Wilxon (Evenson & Wixon, 2006) sugieren que la capacidad de fecundar del espermatozoide empieza a disminuir cuando la FAE es superior al 15%, en cambio otros sugieren que las probabilidades disminuyen a casi cero cuando la FAE >30% (Spanò et al., 2000). Sin embargo, es conocido que un espermatozoide con la cromatina dañada es asimismo capaz de fecundar

correctamente a un ovocito como un espermatozoide con el ADN intacto. Además, el ovocito presenta la maquinaria de reparación del ADN de la que el espermatozoide carece para reparar las roturas que presente (Meseguer et al., 2011). El grado en que estas roturas son reparadas es desconocido, aunque depende principalmente de la edad y calidad del ovocito y del grado de expansión de dichas roturas (Horta et al., 2020; Setti et al., 2021a). Por ello, el impacto que el ADN paterno pueda tener sobre el desarrollo in vivo o in vitro del embrión y en el futuro descendiente sigue siendo un tema controvertido y difícil de cuantificar.

Aun así, diversos estudios hasta la fecha han tratado de identificar y consensuar un valor umbral patológico de FAE, tanto para la predicción de embarazo concebido de manera natural o tras la aplicación de las TRA, como para discriminar entre varones fértiles e infértiles. Ciertamente, se han descrito diferentes valores de FAE para la concepción natural (20,5% mediante SCD con un área bajo la curva (AUC) de 0.90) (Ribas-Maynou et al., 2012), para las técnicas de FIV (11,3% mediante SCSA y AUC=0,75 (Z. Zhang et al., 2016); 20% mediante SCD (Sun et al., 2018), para las de ICSI (15% mediante TUNEL y un AUC=0,53 (Esbert et al., 2018); 17,6% mediante TUNEL y un AUC=0,70 (Avendaño et al., 2010); 30% mediante SCD (Borges et al., 2019); 30,3% mediante SCSA y AUC=0,57 (Z. Zhang et al., 2016)) o ambas técnicas (15% mediante TUNEL (Hervás et al., 2022; Hervás et al., 2022); 27% mediante SCSA (Larson-Cook 2003)). También se ha diferenciado en función de si el análisis se hace en la muestra en fresco o procesado mediante *swim up* o gradientes de densidad, así como si se utilizan ovocitos propios o donados (Meseguer et al., 2011).

Un metaanálisis realizado en 2016, tras el análisis de 30 estudios que evaluaban el efecto de la fragmentación de la cromatina paterna sobre las TRA, concluyó que los diferentes ensayos utilizados actualmente para la determinación clínica de la FAE (TUNEL, SCSA, Cometa y SCD) tienen una capacidad limitada de predecir el embarazo clínico tras la FIV o la ICSI (Cissen et al., 2016). Si bien, un metaanálisis publicado en 2018 sugiere que un valor de corte del 20% puede diferenciar potencialmente entre hombres fértiles e infértiles (Santi et al., 2018). Seleccionaron 28 estudios que incluían un total de 2.883 varones infértiles (con una edad media de 35.2 años) y 1.294 pacientes fértiles (34.2 años) con diferentes grados de alteración en los parámetros seminales y con un examen de FAE en el eyaculado. Los controles fértiles mostraron una concentración y motilidad significativamente mayor comparado con el grupo de infértiles; la FAE fue

significativamente mayor en los varones infértiles. Esta diferencia se mantuvo igual independientemente del método utilizado para medir la FAE (SCSA, TUNEL, SCS y Cometa) y cuando se evaluaron específicamente 8 estudios que compararon hombres con fertilidad probada con aquellos con infertilidad idiopática en la pareja. El análisis de la curva ROC para todo el conjunto de datos y los 4 métodos para determinar la FAE fue de 0.84, identificando el valor del 20% de FAE el punto en el que la prueba tiene más sensibilidad (79%) y especificidad (86%) ($p<0,001$). De entre todos los ensayos para medir el daño en la cromatina paterna, el AUC para el método TUNEL (15 estudios) demostró un valor de 0,83 ($p=0,002$).

Impacto de la FAE en los resultados clínicos

Desde su conocimiento, han sido numerosos los estudios clínicos que se han realizado para averiguar la implicación de la FAE en los resultados reproductivos, tanto en las probabilidades de concepción natural como mediante las TRA.

En la concepción natural, es muy importante la integridad de la cromatina paterna para que el espermatozoide sea capaz de llegar hasta el ovocito y poder fecundarlo. Un estudio del 2000, reportó una relación inversa entre el nivel de FAE y la probabilidad de embarazo natural por ciclo de concepción (Spanò et al., 2000), y el metaanálisis de Zini (Zini, 2011) que incluyó 3 estudios y 616 parejas con alta FAE determinada por el ensayo SCSA señaló una baja probabilidad de concepción natural con un $OR=7,01$ (3,68-13,36). También existe un efecto negativo de una elevada FAE en la probabilidad de obtener embarazo en los ciclos de IA. Existe un metaanálisis (Chen et al., 2019), que incluyó 10 artículos con un total de 2839 ciclos de IA que demostró que unos niveles elevados de FAE en el semen eyaculado superiores al 27% (medido por SCSA y SCD), estaban asociados negativamente con menores probabilidades de embarazo ($RR=0,34$ (0,22-0,52), $p<0,001$) y tasas de recién nacido vivo ($RR=0,14$ (0,04–0,56), $p<0,001$). Otro metaanálisis más reciente (Sugihara et al., 2020) que incluyó 9 estudios y 940 ciclos de IA, obtuvo un resultado similar; las parejas con menor grado de FAE tienen tres veces más probabilidades de concebir tras la IA ($RR=3,3$ (1,16-9,39)). Realizaron además un análisis de sensibilidad (94% (0,88-0,97) y especificidad (19% (0,14-0,26) de la prueba, con un valor predictivo positivo de 17% (0,11-0,26) y un valor negativo predictivo de 95% (0,90-0,98), por lo que es más probable relacionar un alto porcentaje de espermatozoides con la cromatina dañada con una menor probabilidad de embarazo.

Respecto a las técnicas FIV e ICSI, existen multitud de estudios de diversa naturaleza que han tratado de probar si la FAE tiene un efecto negativo en las probabilidades de obtener un recién nacido en casa. Sin embargo, dada la gran heterogeneidad presente en este tema, debido principalmente a diferentes poblaciones de estudio, el empleo de diversas técnicas para cuantificar la FAE y los valores de corte establecidos para determinar una FAE patológica o no, las conclusiones siguen siendo muy variadas. También existen resultados contradictorios en cuanto a si afecta de manera diferente a los resultados de la FIV que de la ICSI.

Por una parte, algunos autores han encontrado que una elevada FAE está asociada con menores tasas de fecundación y peor desarrollo embrionario. El espermatozoide juega un papel importante en el correcto desarrollo embrionario desde el momento de la fecundación (Amdani et al., 2015) y en las divisiones celulares posteriores, pudiendo afectar a la competencia embrionaria (Castillo et al., 2018). De hecho, el efecto del espermatozoide se hace evidente después de la activación embrionaria del genoma paterno en día 3 de desarrollo, conocido como efecto paterno tardío (de Castro et al., 2023; Tesarik et al., 2004). Por ello, se ha correlacionado la FAE con una tasa de llegada a blastocisto más baja (Casanovas et al., 2019; Sedó et al., 2017; Seli et al., 2004) junto con embriones de peor calidad (Avendaño et al., 2010; Borges et al., 2019) en ciclos de FIV e ICSI. De hecho, un grupo ha evidenciado que sería la FAE de doble cadena la que afectaría en mayor medida al desarrollo de los embriones tras la ICSI que el daño en cadena simple (Casanovas et al., 2019). Un metaanálisis (Z. Li et al., 2006) mostró que la probabilidad de fecundación era más baja tras los ciclos FIV cuando existe una FAE elevada (4 estudios, medida por ensayo TUNEL) (RR=0,79 (0.54-1.16, p=0,23), pero no cuando se trataban de ciclos de ICSI (RR=1,03 (0,89-1,18); p=0,70). También, otro estudio retrospectivo con 1.633 ciclos evaluó las tasas de fecundación y de blastocisto de buena calidad entre diferentes grupos de parejas según su nivel de FAE (medida por SCSA) diferenciando entre ciclos de ICSI (n=516) o FIV convencional (n=1117) (Oleszczuk et al., 2016). Encontraron una asociación negativa significativa entre la FAE y la tasa de fecundación en los ciclos de FIV, pero no en los de ICSI, donde los resultados fueron comparables. La misma tendencia existía cuando evaluaron la tasa de blasto de buena calidad, donde el efecto era más evidente en los grupos con una FAE >30% en los ciclos de FIV. De hecho, la odds ratio (OR) de obtener al menos un embrión de buena

calidad por ciclo de punción realizado fue significativamente menor en el grupo de FIV cuando la FAE > 20% mientras que este efecto no se observó en los ciclos de ICSI.

Por otra parte, gracias a la tecnología time-lapse en incubadores, es posible monitorizar todo el desarrollo embrionario y conocer los tiempos de división clave que ayuden a seleccionar los mejores embriones y aumentar las probabilidades de éxito (Del Gallego et al., 2019). Desde su incorporación, se han desarrollado también estudios que evalúan cómo afecta la FAE a la morfocinética embrionaria. En un primer estudio retrospectivo con 971 embriones de 135 ciclos de ICSI (56 ciclos con ovocitos propios y 79 con ovocitos donados), encontraron que cuando la FAE era superior al 20,15% (medida por TUNEL) los embriones procedentes de ovocitos donados tenían un patrón de división mucho más lento que en las demás parejas con menor FAE (Esbert et al., 2018). Un siguiente estudio prospectivo observacional y doble ciego (Casanovas et al., 2019), pudo evaluar el efecto diferencial que tiene la fragmentación de doble cadena frente a la de cadena simple en el desarrollo embrionario. Mediante el ensayo Cometa pudo distribuir a la población de estudio en función de si tenían una FAE de cadena simple o doble, y si era alta o baja. Al comparar los embriones obtenidos a partir de muestras de semen con FAE de doble cadena baja y alta, se observó un retraso estadísticamente significativo en las tasas de extrusión del segundo cuerpo polar, en el tiempo de 4 blastómeras (T4), y en el de ocho (T8), mórula y blastocisto inicial. En cambio, ningún parámetro cinético se vio afectado en los casos con alta y baja FAE pero de cadena simple. El mayor efecto de la FAE lo observaron en los tiempos de extrusión del segundo corpúsculo polar y en los tiempos de mórula, lo que coincide con los puntos de control de daño en el ADN del genoma paterno y embrionario (Casanovas et al., 2019).

Aunque estos estudios demuestran un efecto deletéreo de la FAE sobre el desarrollo de los embriones, el impacto sobre los resultados clínicos en cuanto a las probabilidades de embarazo o si incrementa el riesgo de aborto sigue siendo controvertido. Algunos autores observaron que una elevada FAE paterna implica unas menores tasas de implantación y de embarazo tras FIV e ICSI (Avendaño et al., 2010; Borges et al., 2019; Meseguer et al., 2011; Muriel et al., 2006; Ribas-Maynou et al., 2012; Sedó et al., 2017; Setti et al., 2021b; Simon et al., 2011, 2013) junto con mayor probabilidad de pérdida gestacional. Por ejemplo, el riesgo de no obtener embarazo aumentaba cuando la FAE superaba el umbral del 42% (OR: 24,18 (2,89-522,34); RR: 2,16) en los ciclos de FIV y medido por la prueba Cometa alcalino (Simon et al., 2011). En otro estudio prospectivo con ovocitos donados,

obtuvieron una menor tasa de blastulación y embarazo por transferencia cuando la FAE era superior al 15% (medida por TUNEL), aunque desde el inicio la tasa de fecundación no se vio afectada. También observaron que los casos con mayores niveles de FAE se asociaban con mayor presencia de fragmentación en los embriones, lo que implica menor calidad embrionaria (Sedó et al., 2017). Y cuando se comparó de manera prospectiva los resultados clínicos de 475 ciclos de ICSI realizados con una FAE superior o inferior al 30% (medida por SCD) se encontró que las parejas con FAE>30% tras un desarrollo de los embriones alterado y una menor proporción de blastocistos de buena calidad, la tasa de implantación fue significativamente más baja (33,24% vs 46,4%) a pesar de una tasa de gestación similar (30.40% vs 32.40%). En cambio, la tasa de aborto fue 2,5 veces más alta en parejas con elevada FAE, 42,8% frente a 16,8% (Borges et al., 2019). En relación con la tasa de aborto, un grupo indicó una significativa mayor proporción de roturas de doble cadena en parejas con aborto recurrente de causa desconocida que en donantes fértiles (Ribas-Maynou et al., 2012), lo que podría ser causa de sus numerosas pérdidas gestacionales. También, se encontró una probabilidad el doble de alta, aunque en este caso no significativa, en las parejas con una elevada FAE tras la FIV (OR=1,99 (0,49-8,0) cuando la FAE=30-40%, y OR=2,32 (0,14-38,2) en el grupo FAE>40%), pero en cambio, este efecto solo se observó en los ciclos de ICSI cuando la FAE >40% (OR=3,08 (0,72-13,1); p=0,12) (Oleszczuk et al., 2016).

Como la FAE afecta reduciendo las probabilidades de gestación e incrementando el riesgo de aborto, los autores también han encontrado una menor tasa de recién nacido vivo, aunque este efecto podría ser más evidente en los ciclos de FIV, pero no en los de ICSI. La probabilidad de obtener un niño en casa fue significativamente más baja en las parejas con una FAE>20% (medida por SCSA) (OR=0,61 (0,38-0,97), p=0,04) que cuando fue FAE >10-20% (OR=0,95 (0,70-1,29) (0,76). Por el contrario, observaron la misma OR en los ciclos de ICSI para los mismos grupos (OR=1,29 (0,70-2,37) (p=0,42) y OR=1,28 (0,69-2,36) (p=0,43), respectivamente) (Oleszczuk et al., 2016). Asimismo, Simon en su estudio prospectivo (Simon et al., 2013) halló que en las parejas que realizaron FIV (n=203), aquellas con una FAE <25% (medido por el ensayo Cometa alcalino) tuvieron una tasa de nacidos vivos del 33%; por el contrario, las parejas con fragmentación más alta al 50% tuvieron una tasa de nacidos vivos mucho más baja, del 13% (p=0,007). En cambio, cuando analizaron los ciclos de ICSI (n=136 parejas), no se encontraron diferencias significativas entre ningún grupo de pacientes.

Sin embargo, también se encuentran pruebas contradictorias de estudios tanto prospectivos como retrospectivos que indican que el daño en el ADN espermático no está directamente relacionado con peores resultados de embarazo tras FIV y la ICSI (Antonouli et al., 2019; Esbert et al., 2011; Green et al., 2020; Hervás et al., 2022; Hervás et al., 2022; Ten et al., 2021). Un estudio prospectivo de 178 parejas con FAE en el eyaculado que se realizaron 68 ciclos de FIV y 116 de ICSI (77 con ovocitos propios y 101 con ovocitos donados), no encontró correlación entre la FAE medida por TUNEL y los resultados clínicos en ambos tipos de tratamiento. Cuando evaluaron a las pacientes en función de si habían obtenido o no embarazo tras la FIV ante el mismo número medio de embriones transferidos, el grado de FAE fue comparable entre ambos grupos, tanto en ciclos con ovocitos propios (21,2% y 18,2%) como con ovocitos donados (18,7% y 19,9%). Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de embarazo, cuando diferenciando entre pacientes y receptoras, se establecieron dos grupos en función de la FAE menor o mayor al 36%. En los ciclos de pacientes con ovocitos propios, la tasa de embarazo fue 48,1% versus (vs) 36,4%, mientras que, en las pacientes con ovocitos donados, 61,7% vs 46,7%, respectivamente. Aunque la tasa de aborto siempre fue mayor en las parejas con FAE >36%, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Esbet et al., 2011). En otro estudio prospectivo con 150 parejas del programa de ovodonación (Antonouli et al., 2019), el nivel de FAE no se correlacionó significativamente con la tasa de fecundación de ovocitos ($r = -0,10$), el número total de blastocistos ($r = -0,07$), la obtención de blastocistos de buena calidad ($r = -0,27$) o la gestación clínica ($r = -0,05$). Por último, cuando se dividió a la población de estudio en función del umbral 25% de FAE medida por SCD, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de gestación: 68,2% en las parejas con FAE<25% y 56,1% en las parejas con FAE>25%.

El mismo resultado se encontró posteriormente en otro estudio prospectivo con 246 parejas que se sometieron a un ciclo de ICSI y diagnóstico genético preimplantación para aneuploidías (PGT-A) (Green et al., 2020), en el cual la población de estudio se dividió en dos grupos en base a tener un nivel FAE medido por SCSA el día de la inseminación mayor o menor al 15%. No hubo diferencias en las tasas de fecundación (86,3% vs 84,2%, OR ajustado= 0,86 (0,63-1,18)), de blastulación (49,5% vs 48,8%, OR ajustado= 1,02 (0,75-1,36)), ni en la tasa de euploidía (55,7% frente a 52,1%, OR ajustado= 0,96 (0,7-1,31)) entre los grupos de FAE baja y alta, respectivamente. Los resultados clínicos

fueron similares entre ambos grupos, siendo la tasa de implantación (68,8% vs 79,8%), la tasa de gestación evolutiva (65,9% vs 72,6%) y la tasa de aborto (4,2% vs 8,8%), respectivamente. Tampoco encontraron peores resultados reproductivos por FAE elevada en un estudio prospectivo doble ciego, independientemente de la calidad del semen y del origen de los ovocitos (Ten et al., 2021). La población de estudio se dividió en tres grupos diferentes, 68 parejas con factor masculino severo y respuesta ovárica normal que se realizaron un ICSI; 113 parejas se realizaron FIV con ovocitos donados por fallo ovárico; y 150 parejas con baja respuesta ovárica y se realizaron tanto FIV como ICSI. Para cada uno de los grupos, no se encontró una correlación entre el grado de FAE medido siempre por TUNEL y los resultados reproductivos tasa de embarazo clínico, gestación clínica y aborto en el primer trimestre.

En dos consecutivos estudios retrospectivos (Hervás et al., 2022; Hervas et al., 2022), tampoco encontraron diferencias en los resultados clínicos de las parejas con una FAE mayor al 15% (medida por TUNEL) que se sometieron a FIV o ICSI, tanto cuando utilizaron ovocitos propios (n=1.339 parejas y 2.759 IVF/ICSI) como cuando utilizaron ovocitos donados (n=864 parejas y 1903 ciclos de ICSI). En este caso, se evaluó la probabilidad de tener un recién nacido a lo largo del tiempo mediante las tasas acumuladas de recién nacido vivo (TARNV), análisis que ningún otro estudio previo ha realizado. De esta manera, se puede evaluar cuánto le cuesta a una pareja obtener un recién nacido en casa en el caso de tener una FAE elevada según el número de ovocitos utilizados, embriones transferidos y transferencias realizadas. Los resultados demostraron que no existe un efecto deletéreo de una alta FAE sobre dicha probabilidad en ninguna de las tres aproximaciones realizadas para ambos tipos de ovocitos utilizados, propios y donados. De hecho, la evaluación del éxito reproductivo mediante las TARNV por ovocito utilizado permite hacer una estimación más precisa del impacto que tiene el espermatozoide desde el inicio del ciclo, evitando los sesgos de selección embrionaria que ocurren cuando se evalúan los resultados clínicos por transferencia, ya que siempre se transfieren los embriones de mejor calidad. De este modo, si los pacientes necesitan inseminar un mayor número de ovocitos para obtener un recién nacido vivo, es mayor el efecto negativo del espermatozoide con FAE sobre el ciclo. En este caso, tanto con ovocitos donados como con ovocitos propios, las parejas con una elevada FAE en el eyaculado no tuvieron que recurrir a más ovocitos para obtener un niño.

La gran heterogeneidad entre los artículos publicados también se refleja en la gran cantidad de metaanálisis realizados con conclusiones también controvertidas. Por una parte, están aquellos que señalan un efecto negativo de la presencia de espermatozoides con FAE en parejas que buscan concebir. Una revisión sistemática y metaanálisis en 2008 (Collins et al., 2008) de 2.162 ciclos de TRA que evaluaban el efecto de la fragmentación de la cromatina paterna sobre los resultados reproductivos demostró un efecto deletéreo sobre las probabilidades de embarazo, con una OR de 1,44 (1,03-2,03), siendo el mismo efecto para la FIV como para la ICSI. En ese mismo año, un estudio similar con 1.549 ciclos de FIV/ICSI concluyó que la FAE también predice la pérdida de embarazo (OR combinada=2,48 (1,52-4,04); $p>0,0001$), y el subanálisis realizado solamente con los ciclos de ICSI obtuvo la misma conclusión (OR combinado=2,73 (1,43-5,20); $p<0,01$) (Zini et al., 2008). En 2014, otra revisión sistemática y metaanálisis que incluyó un total de 3.106 parejas encontró un resultado similar; la probabilidad de aborto era más alta en las parejas con niveles más elevados de FAE tras la ICSI (OR=2,68 (1,40-5,14), $p=0,003$) (Zhao et al., 2014). Otro estudio (Simon et al., 2017), que incluyó un total de 56 estudios y 8.068 ciclos, obtuvo resultados que indicaban que la FAE tiene un efecto negativo significativo tanto sobre las probabilidades de obtener gestación clínica por FIV (16 estudios, 9363 ciclos, OR=1,15 (1,05-1,27), $p=0,003$), como por ICSI (6.260 ciclos, OR=0,89 (0,80-0,99), $p=0,002$).

Varios estudios pudieron reportar una asociación significativa entre la FAE y la disminución de la probabilidad de embarazo en los ciclos de FIV, pero no en los ciclos de ICSI (Z. Li et al., 2006; Osman et al., 2015; Z. Zhang et al., 2015; Zini, 2011). El metaanálisis de Osman (Osman et al., 2015) que incluyó 6 estudios previos, reportó una tasa de recién nacido significativamente más alta en los varones con baja FAE en comparación con los que la tenían elevada en los ciclos de FIV (RR=1,27 (1,1- 1,5); $p=0,01$), pero esta relación no se encontró en los ciclos de ICSI (RR=1,11 (1-,23); $p=0,04$). Unos resultados similares también encontraron Zhang y colaboradores (Z. Zhang et al., 2015) en su estudio en el que incluyó los resultados de 20 estudios (3671 parejas), y que para su análisis se dividieron en tres grupos según el valor de la FAE (>27 %, 15-27 %, ≤ 15 %); para cada grupo, se realizó un análisis de subgrupos según el tipo de inseminación (FIV o ICSI) y los métodos de análisis de la FAE. Los OR agrupados demostraron que las parejas con una FAE<27% tenían más probabilidades de alcanzar una gestación clínica (OR=1.44 (1.186–1.742), $p=0,000$). Si se tiene en cuenta el tipo de

inseminación, la OR en los casos de FIV fue similar ($RR=1,74$ ($1,38-2,2$), $p=0,000$), pero el resultado no fue estadísticamente significativo en los ciclos de ICSI ($OR=0,90$ ($0,63-1,27$), $p=0,537$). En cambio, el efecto de la FAE se diluyó cuando se consideró a su vez la técnica utilizada para medirla; si se medía por TUNEL, existía una mayor probabilidad de gestación si la $FAE < 27\%$ ($OR=1,87$ ($1,36-2,58$), $p=0,000$), mientras que la FAE por SCSA no encontró esa asociación ($OR=1,24$ ($0,98-1,58$), $p=0,076$).

En otro estudio a gran escala publicado recientemente (Ribas-Maynou et al., 2021) que comprendía 12.380 ciclos de FIV/ICSI con un análisis de FAE, el metaanálisis reveló que considerando conjuntamente los resultados de ambos tipos de tratamiento, la tasa de implantación ($RR=0,74$ ($0,61-0,91$) y la tasa de embarazo ($RR=0,83$ ($0,73-0,94$) están influidas negativamente por el daño en el ADN espermático, aunque tras el ajuste por sesgo de publicación la relación para la tasa de embarazo dejó de ser significativa. La tasa de recién nacido vivo mostró una reducción ante la FAE, pero de manera no significativa ($RR=0,78$ ($0,58-1,06$). En el momento en que se separaron ambos tipos de ciclos, los resultados de la FIV se ven influidos negativamente y de manera significativa por los daños en la cromatina paterna en las tasas de implantación ($RR=0,68$ ($0,52-0,89$) y de embarazo ($RR=0,72$ ($0,55-0,95$), pero no en la tasa de recién nacido vivo ($RR=0,48$ ($0,22-1,02$). En el caso de la ICSI, se observaron una tendencia, pero no significativa en las tasas de implantación ($RR=0,79$ ($0,60-1,04$) y de embarazo ($RR=0,89$ ($0,78-1,02$), y en la tasa de nacidos vivos ($RR=0,92$ ($0,67-1,27$).

En cambio, otros autores no han sido capaces de encontrar dicha asociación. Por ejemplo, el metaanálisis de Deng et al. (2019) (10 estudios, 1.785 parejas) mostró que la probabilidad de conseguir un recién nacido no era estadísticamente diferente entre el grupo de FAE baja y alta ($RR=0,87$ ($0,8-1,1$); $p=0,2$), aunque las parejas con una fragmentación más alta tenían un mayor riesgo de aborto espontáneo, menor tasa de embriones de buena calidad y menor tasa de embarazo clínico.

Pueden ser varios los motivos de la enorme discrepancia existente en la literatura, empezando por los diferentes criterios de inclusión en los estudios (distintas poblaciones con diferentes problemas de fertilidad), la técnica de medición de la FAE, la técnica de inseminación utilizada (FIV o ICSI), hasta los métodos estadísticos utilizados para analizar los datos. La evidencia hasta ahora muestra que el tamaño del efecto de la FAE sobre los resultados reproductivos depende de la técnica utilizada, siendo mayor en los ciclos de FIV que en los de ICSI. Según los autores, el motivo puede estar relacionado

con el hecho de que para la FIV, la competencia del gameto masculino desempeña un papel más relevante en la fecundación, ya que tiene que ser capaz de nadar y penetrar las capas de células que rodean el ovocito, barreras que con la ICSI se saltan. En cambio, otros autores han encontrado recientemente que los espermatozoides seleccionados para la ICSI presentan un menor grado de FAE de cadena simple, pero no doble (Lara-Cerrillo et al., 2021). No obstante, también tiene un papel importante en los resultados clínicos el factor femenino que pudiera existir en la población objeto de estudio, ya que el éxito reproductivo de la pareja depende también en gran medida de la edad del ovocito. Ovocitos de mujeres jóvenes tienen un citoplasma más competente y la maquinaria necesaria para reparar o reducir el porcentaje de roturas del ADN paterno que un ovocito de mujer más añosa, sin que tenga consecuencias negativas sobre el potencial reproductivo (Horta et al., 2020; Meseguer et al., 2011).

Estrategias para disminuir el impacto de la FAE en los resultados reproductivos

Ante una FAE elevada diversos autores han sugerido diferentes estrategias para disminuir el porcentaje de espermatozoides con la cromatina dañada, tanto in vivo, con el uso de antioxidantes orales y/o un estilo de vida saludable, o periodos de abstinencia más cortos; como in vitro, aplicando técnicas de selección espermática o intervenciones que ayuden a reducir el número de espermatozoides con FAE disponibles para la inseminación, con el objetivo de mejorar el pronóstico reproductivo de la pareja.

Entre los procedimientos in vivo disponibles, el uso de antioxidantes orales es una de las primeras estrategias aplicadas por los clínicos para reducir el número de espermatozoides con la cromatina fragmentada en el eyaculado. Una de las causas principales de FAE es el desbalance entre los agentes antioxidantes y las ERO, que pueden atacar directamente a las bases nitrogenadas del ADN cambiando su configuración o aductos, o indirectamente mediante la peroxidación lipídica o activando rutas de señalización relacionadas con la apoptosis (Agarwal et al., 2014).

Diversos estudios han evaluado si la toma de antioxidantes orales ayudaría a reestablecer el equilibrio oxido-reductor y disminuir la cantidad de agentes oxidantes del ambiente testicular que puedan atacar al ADN espermático. Entre los compuestos más comunes encontramos la Coenzima Q10, L-Carnitina, Zinc, Vitamina D, Vitamina E y N-Acetilcisteína (Romano et al., 2023). El uso de estas moléculas se ha relacionado con una

mejora en los parámetros seminales, sobre todo referido a la motilidad y vitalidad espermática (Romano et al., 2023), y algunos autores han encontrado una mejora de los resultados clínicos en las parejas donde el varón tomó antioxidantes durante un periodo de tiempo tras la disminución de los niveles de FAE en el eyaculado (Alahmar et al., 2021; Greco, Romano, et al., 2005). Sin embargo, otros autores han fallado en encontrar una mejora de los resultados clínicos tras la suplementación con antioxidantes y vitaminas antes del tratamiento de infertilidad mediante ICSI. Un ensayo controlado aleatorizado sobre 171 varones infértiles (Steiner et al., 2020) con una FAE en el eyaculado superior al 25% se sometieron entre 3-6 meses de terapia con antioxidantes o placebo. Tras 3 meses, no obtuvieron ninguna diferencia en la FAE entre el grupo de tratados y no tratados, obteniendo ambos grupos tasas similares de gestación clínica, aborto y recién nacido. Otro estudio de mismo diseño con 2.370 parejas (Schisterman et al., 2020), tras 6 meses de terapia con diferentes compuestos antioxidantes (zinc y ácido fólico), obtuvieron parámetros seminales y una tasa de recién nacido vivo similar al grupo placebo. De hecho, el nivel de FAE del grupo con toma de antioxidantes fue un 2,4% superior al grupo placebo. En realidad, algunos autores han señalado que el uso excesivo de antioxidantes puede provocar un efecto reverso y originar un desbalance reductor en vez de oxidante, originando niveles más altos de FAE (Henkel et al., 2019).

En el caso de elevada FAE por hábitos de vida poco sanos, como el tabaquismo, obesidad, o el contacto con sustancias nocivas y radiactivas, la estrategia a seguir es reducir los factores de riesgo y cambiar el estilo de vida (Agarwal, Majzoub, et al., 2020; Romano et al., 2023). En cambio, la presencia de espermatozoides con elevada FAE por varicocele, la estrategia clínica a seguir sería la varicocelectomía, es decir, la reparación de la circulación testicular mediante una intervención. En una revisión sistemática de 21 estudios que evaluaron el efecto de la varicocelectomía sobre los niveles de FAE, obtuvieron una reducción significativa de aproximadamente un 8% en los niveles de fragmentación (Roque & Esteves, 2018). También, la reparación del varicocele parece mejorar los resultados reproductivos, mejorando las probabilidades de embarazo tanto por concepción natural como por TRA (Smit et al., 2013). Por último, una de las últimas estrategias propuestas para disminuir la fragmentación de los espermatozoides es reducir el tiempo de abstinencia entre eyaculaciones, sobre todo en las TRA. Un estudio de 7 varones demostró una reducción significativa de la FAE medida por TUNEL tras 1-2 días de abstinencia (9-10%) en comparación con periodos de abstinencia de más de 9 días (15-

21%) ($p < 0,001$) (Agarwal, Gupta, et al., 2016). Esta estrategia también se ha probado clínicamente con la mejora de los resultados reproductivos; se obtuvo un incremento en la tasa de embarazo clínico tras la IA cuando se utilizaron muestras con un periodo de abstinencia de dos días o menos en comparación con tres o más días (11,3% frente a 6-7,3%; $P < 0,05$) (Marshburn et al., 2010) y tasas de embarazo significativamente mejores tras la ICSI, cuando la eyaculación recurrente se realizó en los últimos cuatro días antes del procedimiento y se utilizó un periodo de abstinencia final de 12 horas (Sánchez-Martín et al., 2013).

En el caso de que se mantenga un nivel elevado de fragmentación en el semen eyaculado o no se disponga de tiempo suficiente para probar a reducirla es posible aplicar técnicas de selección espermática antes de las TRA. Para algunos autores, el simple proceso de capacitación realizado en el laboratorio sobre la muestra seminal antes de la inseminación (gradientes de densidad y *swim up*) disminuiría los niveles de FAE (Jayaraman et al., 2012; Muratori et al., 2019; Oguz et al., 2018; Zini et al., 2000).

Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado dispositivos que ayudarían a seleccionar espermatozoides de mejor calidad por sus características intrínsecas y un menor grado de fragmentación de la cromatina. Un ejemplo de ello es el PICSI (*Physiological ICSI*) o ICSI fisiológico, que se basa en la capacidad que tiene el espermatozoide maduro de unirse al ácido hialurónico (AH) mediante los receptores presentes en su cabeza, mimetizando la unión de este a las células de la granulosa del ovocito que ricas en este polisacárido (Avalos-Durán et al., 2018; Martin-Deleon, 2011). Diversos estudios han mostrado que los espermatozoides móviles unidos a las gotas de AH del dispositivo presentan un menor grado de FAE, aparte de una mayor madurez citoplasmática y nuclear, y, por tanto, mayor calidad para dar lugar a un desarrollo embrionario óptimo (Muratori et al., 2019; Parmegiani et al., 2010; Yagci et al., 2010). En este último estudio (Yagci et al., 2010), hallaron que el 99% de los espermatozoides unidos al AH presentaban el ADN íntegro, mientras que sólo un 55% lo hacían en la muestra de semen.

También sería posible seleccionar espermatozoides con menor FAE mediante la aplicación del MACS (*Magnetic-activated cell sorting*), método de selección negativa que separa los espermatozoides apoptóticos, aquellos que externalizan la fosfatidil-serina en su membrana, de los que no apoptóticos disponibles para su uso (Gil Juliá et al., 2022). Un estudio evaluó de manera retrospectiva los resultados de la ICSI en varones con una

FAE>20% (medida por TUNEL) a los que o bien la muestra seminal se preparó mediante gradiente de densidad y MACS (n=366) u otros varones (n=358) a los que solo se les aplicó gradiente de densidad. En este caso, los resultados fueron significativamente mejores en la tasa de embarazo clínico (60,7% vs 51,5%; p=0,014) y tasa de recién nacido vivo (47,4% vs 31,2%; p=0,001) en el grupo en el que se aplicó el MACS (Pacheco et al., 2020). En cambio, otro estudio retrospectivo con varones con elevada FAE (305 parejas), no halló diferencias en los resultados clínicos entre las parejas en las que se solamente se les realizó el gradiente de densidad y aquellas a las que se les aplicó gradiente de densidad y MACS, tanto si la FAE era moderada (30-50%) o elevada (>50%), como en ciclos con ovocitos propios (n=216) y con ovocitos donados (n=89) (Sánchez-Martín et al., 2017). No obstante, cuando se compararon ambas técnicas de selección espermática, PICSi vs MACS, mediante un ensayo aleatorizado controlado en 413 ciclos de ICSI con varones con una FAE>20,3% (medida por TUNEL), no se encontraron diferencias significativas entre ambos en la tasa de implantación, gestación clínica y gestación evolutiva. Sin embargo, cuando los resultados se estratificaron por la edad de la mujer, los resultados clínicos en mujeres menores a 30 años se vieron mejorados con el MACS mientras que con el PICSi se ven mejorados los resultados en mujeres más mayores (30-35 años) (Hasanen et al., 2020).

También, la selección morfológica de espermatozoides para la ICSI, denominado IMSI, podría utilizarse para escoger aquellos con menos FAE (Hammoud et al., 2013). En un ensayo que incluyó a 80 varones infértiles, la FAE medida mediante TUNEL fue significativamente inferior en el grupo de IMSI en comparación con el grupo de ICSI (P<0,0001) (Mangoli et al., 2020). Un metaanálisis que incluyó estudios que comparaban los resultados de la IMSI y la ICSI en parejas con fallos previos de ICSI o factor masculino, encontró una mejora significativa de las tasas de implantación (OR=1,56; p=0,01) y de embarazo (OR=1,61; p=0,004) con la IMSI, en comparación con el tratamiento estándar, pero no hubo diferencias en las tasas de aborto espontáneo (Setti et al., 2014). Sin embargo, el último metaanálisis realizado por Cochrane, que incluyó 13 estudios aleatorizados controlados (Randomized Controlled Trial, RCT) con 2775 parejas comparando IMSI (n=1256) vs ICSI (n=1519), no recomienda el uso rutinario del IMSI, ya que no sostiene el incremento de la probabilidad de embarazo utilizando esta técnica debido a la heterogeneidad de los estudios realizados y la baja calidad de los mismos (Teixeira et al., 2020).

En los últimos años, se han desarrollado los dispositivos de microfluídica, que se basan en la capacidad que tienen los espermatozoides de nadar atravesando membranas y canales, asemejando el recorrido de estos por el aparato reproductor femenino hasta llegar al óvulo simulando un entorno in vivo (Pardiñas et al., 2022). Estos dispositivos seleccionan espermatozoides en función de diferentes condiciones espermáticas, como la motilidad/migración progresiva o las interacciones espermáticas. El mecanismo que se emplea para la selección puede ser activo (flujo laminar, gradientes químicos o electroforesis) o pasivo (filtración de los espermatozoides a través de membranas porosas) (Nosrati et al., 2017). Se ha determinado que cualquiera de estos sistemas es capaz de seleccionar espermatozoides con una mayor integridad del ADN espermático. Un estudio piloto reciente demostró que el porcentaje de espermatozoides en varones con alta fragmentación de doble cadena (>60%) medido por el ensayo Cometa, disminuye significativamente tras su paso por un sistema de microfluídica, 34,9%, comparado con la muestra procesada mediante *swim up* (65%) (Pujol et al., 2022). Otro estudio similar (Quinn et al., 2018), realizó una comparativa entre los niveles de FAE de una misma muestra de semen sin procesar y procesada por gradiente de densidad y por microfluídica. La mediana de FAE de la muestra sin procesar fue del 21%, mientras que el grado de FAE para las muestras procesadas mediante microfluídica fue cercada a 0% ($p<0,0001$) y las muestras centrifugadas por gradiente de densidad un 6% ($p=0,0029$).

Diversos autores han confirmado la mejora de los resultados clínicos tras la ICSI de espermatozoides seleccionados mediante microfluídica (Kocur et al., 2023; Lara-Cerrillo et al., 2023; Quinn et al., 2018). El estudio prospectivo de Kocur sobre 57 parejas (71 ciclos de ICSI con PGT-A y con alta tasa de aneuploidía embrionaria) que tenían una FAE media de 26,2% y una fragmentación de doble cadena media de 3,6%, encontró una disminución significativa en la proporción de espermatozoides con la cromatina fragmentada cuando se procesó la muestra por microfluídica (1,9% y 0,3% de doble cadena) que cuando se procesó anteriormente por gradiente de densidad (18% y 3,1% de doble cadena) ($p<0,001$). La tasa de euploidía mejoró considerablemente en el ciclo de ICSI cuando utilizaron la selección por microfluídica (42,9%) que en su anterior ciclo con selección por gradiente de densidad (25,3%) (Kocur et al., 2023). Mientras, otros autores no han obtenido dicha mejora, sino que los resultados reproductivos son muy similares entre los grupos que utilizaron microfluídica y los que procesaron el semen de manera convencional (Ferreira Aderaldo et al., 2023; Yalcinkaya Kalyan et al., 2019).

Específicamente, el metaanálisis realizado por Ferreira (Ferreira Aderaldo et al., 2023) reveló una ligera mejora en los resultados de embarazo clínico y de aborto cuando se usa la microfluídica frente a las técnicas convencionales de preparación seminal *swim up* y gradiente de densidad, aunque sin significancia estadística.

Otros autores, sin embargo, sugieren el uso de espermatozoides testiculares en pacientes con elevada FAE para mejorar sus resultados reproductivos. Se basan en la evidencia de que los espermatozoides obtenidos directamente del testículo presentan un menor grado de fragmentación del ADN que los ya eyaculados (S. C. Esteves et al., 2023; Greco, Scarselli, et al., 2005). De hecho, un estudio evaluó el nivel de FAE de los espermatozoides obtenidos a distintos niveles del aparato reproductor masculino, obteniendo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de roturas entre los espermatozoides del eyaculado, del conducto deferente, del epidídimo y del testículo (Xie et al., 2020). A pesar de recurrir a una técnica invasiva para obtener estos espermatozoides, son varios los grupos que han encontrado un aumento significativo de la probabilidad de embarazo y de tener un recién nacido en las parejas que cambian el origen del espermatozoide del eyaculado a testicular (Alharbi et al., 2020; Arafa et al., 2018; S. C. Esteves et al., 2015; Herrero et al., 2019).

En la literatura publicada se encuentran estudios que comparan los distintos métodos de selección espermática en pacientes con una elevada FAE en el eyaculado. Bradley (Bradley et al., 2016) realizó un extenso estudio retrospectivo con los resultados clínicos de 1.942 varones infértiles con elevada FAE en sus espermatozoides del eyaculado sin ningún fallo previo de TRA, a los que se dividió en dos grupos en función de si habían realizado uno de los métodos de selección espermática (PICSI, IMSI, TESE (Extracción de espermatozoides del testículo)/ TESA (Aspiración de espermatozoides del testículo), o eyaculación frecuente) o no, previo a la inseminación por ICSI. Los varones fueron divididos en dos grupos según si el nivel de FAE era mayor o menor al 29% en el eyaculado medido por el ensayo de la integridad de la cromatina espermática. Cuando no se aplicó ninguna intervención sobre la muestra seminal antes de la ICSI, los varones con elevada FAE tuvieron peores tasas de fecundación, de gestación y de recién nacido vivo que aquellos varones con baja FAE. Pero cuando se aplicó cualquiera de los métodos de mejora espermática, los varones con elevada FAE obtuvieron una mejora de los resultados reproductivos, de hecho, obtuvieron más blastocistos de mejor calidad que después de la transferencia dieron lugar a una mayor tasa de recién nacido que cuando no se realizó

ninguna intervención (43,8% y 24,9%, respectivamente). Si se separan los resultados clínicos en función de la intervención realizada en parejas con FAE >29%, las parejas que utilizaron espermatozoides testiculares obtuvieron una mayor tasa de gestación clínica tras la transferencia de un único embrión (56%) que los que realizaron IMSI (28,7%) y PICSI (44,5%), siempre mejor que los ciclos de ICSI sin ninguna intervención aplicada (26,8%) ($p<0,01$). También la tasa de recién nacido vivo fue significativamente mayor en los ciclos TESE/TESA (49,8%) que en los ciclos sin intervención (24,2%), pacientes con PICSI (38,3%) y pacientes con IMSI (28,7%) ($p<0,05$).

Sin embargo, otro estudio más reciente (Hozyen et al., 2020), realizó un ensayo controlado aleatorizado con 320 parejas con elevada FAE en el eyaculado (medida mediante TUNEL) a las que se asignó un método de selección espermática (PICSI (n=78), MACS (n=79) o utilización de espermatozoides testiculares (n=73) comparado con el método de preparación habitual mediante gradientes de densidad como grupo control del estudio. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la edad femenina y masculina y el nivel de FAE. Cuando evaluaron la tasa de embriones en día 3 y de llegada a blastocisto, el grupo testicular fue el que presentó de manera significativa menores tasas. Los grupos gradiente de densidad y MACS presentaron una tasa significativamente mayor de blastocistos de buena calidad respecto al grupo PICSI y Testicular ($p=0,014$). La mayor tasa de embarazo la obtuvo el grupo PICSI (69,6%), mientras que la menor la obtuvo el grupo con el procesamiento mediante gradiente de densidad (51,4%) ($p=0,025$), siendo 67,1% para el grupo MACS y 56,2% en el grupo con espermatozoides testiculares. Los grupos PICSI (62,8%) y MACS (62%) fueron los que obtuvieron mayores tasas de embarazo evolutivo, siendo el grupo con gradiente de densidad la más baja (45,8%). No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos en la tasa de aborto ni evaluaron la tasa de recién nacido vivo.

USO DE ESPERMATOZOIDEOS TESTICULARES EN VARONES NO AZOOSPÉRMICOS

El uso de espermatozoides procedentes del testículo se ha propuesto como estrategia clínica para mejorar los resultados reproductivos en casos de varones con suficientes espermatozoides en el eyaculado pero que presentan una elevada FAE (Alharbi et al., 2019; Arafa et al., 2018; S. C. Esteves et al., 2015; Greco, Scarselli, et al., 2005; Herrero

et al., 2019; Mehta et al., 2015; Pabuccu et al., 2017) y/o un cuadro de infertilidad masculina grave (Abhyankar et al., 2016; Al-Malki et al., 2017; Ben-Ami et al., 2013; Kendall Rauchfuss et al., 2021; Negri et al., 2014). En algunos casos, también se ha planteado el cambio a esta estrategia cuando la pareja presenta varios fallos previos de ICSI, entendidos como la ausencia de fecundación, el bloqueo embrionario o la no consecución de embarazo tras la transferencia de todos los embriones generados (Weissman et al., 2008).

Históricamente, el uso de espermatozoides extraídos del testículo estaba reservado a los varones diagnosticados con azoospermia obstructiva o secretora (S. C. Esteves et al., 2011), ya que es el único procedimiento que disponen para utilizar sus gametos y obtener descendencia biológica. Sin embargo, hasta la fecha diferentes estudios realizados han demostrado la mejora en los resultados clínicos y un aumento de las probabilidades de embarazo usando espermatozoides testiculares en varones con espermatozoides en el eyaculado (Abhyankar et al., 2016; Alharbi et al., 2019; S. C. Esteves et al., 2015; Greco, Scarselli, et al., 2005; Herrero et al., 2019; Mehta et al., 2015; Weissman et al., 2008).

De acuerdo con la fisiología reproductiva masculina, los espermatozoides presentes en el eyaculado presentan un estado madurativo óptimo y un potencial de fecundación mayor debido a los cambios experimentados por su paso por los diferentes conductos reproductivos (Vallet-Buisan et al., 2023). No obstante, se ha confirmado que los espermatozoides obtenidos del testículo también son capaces de fecundar con éxito y dar lugar a un correcto desarrollo embrionario y recién nacido vivo sano (Nagy et al., 1995). De hecho, los primeros estudios hallaron resultados clínicos similares entre los ciclos de ICSI utilizando espermatozoides testiculares y los ciclos con espermatozoides del eyaculado (Hourvitz et al., 1998), y cuando se usaron espermatozoides del epidídimo (Silber et al., 1995). En un estudio comparativo de los resultados de la ICSI, el uso de espermatozoides testiculares de varones con azoospermia no obstructiva comparado con varones con oligoastenoazoospermia severa y varones normozoospermicos, se asoció a tasas de fecundación y calidad embrionaria inferiores, pero las tasas clínicas no se vieron afectadas posteriormente, encontrando resultados de embarazo y neonatales comparables entre los tres grupos (Oron et al., 2014). De hecho, un estudio reciente (S. H. Lee et al., 2018) comparó los resultados de 141 ciclos de ICSI usando espermatozoides eyaculados (135 parejas) y 37 ciclos usando espermatozoides testiculares (35 parejas con diagnóstico de azoospermia obstructiva y no obstructiva). La valoración cualitativa de los embriones a

lo largo del desarrollo embrionario reveló que no había diferencias significativas en la tasa de llegada a blastocisto ni en la calidad de estos (46,1% vs. 47,5%, y 5,7% vs 5,8%, respectivamente). Tras la transferencia de embriones en día 5 en todos los ciclos, ambos grupos, eyaculado y testicular, obtuvieron una tasa de embarazo clínico (44,7 vs. 43,2%; $p=0,87$), de aborto (21,7% vs. 33,3%; $p=0,33$), y de parto (76,5 vs. 66,7%; $p=0,53$) comparable.

Uso de espermatozoides testiculares en varones con elevada FAE en el eyaculado

Aunque el espermatozoide del eyaculado muestre signos de mayor calidad que los espermatozoides aún residentes en el testículo, uno de los argumentos a favor del uso de estos es su bajo grado de fragmentación del ADN. La exposición a diferentes factores y agentes oxidantes tras la salida del testículo provoca una mayor probabilidad de daño en la cromatina espermática. De hecho, un primer estudio realizado en 2005 con un modelo animal murino demostró cómo el daño de la cromatina espermática es significativamente menor en el testículo que en el eyaculado (Suganuma et al., 2005). Esto fue corroborado posteriormente en los diferentes estudios clínicos realizados en humanos, en los que se manifestó que el grado de FAE en los espermatozoides eyaculados es significativamente mayor que en los residentes en el testículo (S. Esteves et al., 2018; S. C. Esteves et al., 2015; Greco, Scarselli, et al., 2005). Como ejemplo, un pequeño estudio de 12 varones con alta FAE (medida por TUNEL) incluso después de tres meses de terapia antioxidante oral, encontró una reducción significativa del nivel de fragmentación entre los espermatozoides del eyaculado y los obtenidos por TESE en el mismo día ($39,7\% \pm 14,8$ vs $13,3\% \pm 7,3$; $p<0,01$) para la ICSI (Moskovtsev et al., 2010). Asimismo, un estudio realizado en 2020 con muestras de espermatozoides obtenidas a diferentes niveles del tracto reproductor masculino demostró como la FAE va aumentando a medida que los espermatozoides recorren los diferentes conductos tras su salida del testículo: $11,4\% \pm 6\%$ en el testículo, $15,8\% \pm 8\%$ en el epidídimo, $20,4\% \pm 10\%$ en los vasos deferentes, y un $32,9\% \pm 20\%$ en el eyaculado de los controles (Xie et al., 2020).

La primera vez que se demostró la eficiencia de los espermatozoides testiculares en los ciclos de ICSI con elevada FAE en el eyaculado fue en 2005 (Greco, Scarselli, et al., 2005). En este estudio compararon los resultados clínicos de 18 parejas con elevada FAE en el eyaculado (medido por TUNEL) y dos fallos previos de ICSI que optaron por utilizar

espermatozoides testiculares en su siguiente ciclo. En estos varones, el grado de FAE en el testículo fue de 4,8% frente a 23,6% en los espermatozoides del eyaculado; tras el cambio en el origen del espermatozoide obtuvieron, respectivamente, una mejora en la tasa de fecundación (74,9% vs 70,8% ($p>0,05$), de implantación (20,7% vs 1,8% ($p<0,01$)) y de embarazo (44,4% vs 5,6% ($p>0,05$)). Posteriormente, un estudio de casos (Weissman 2008) presentó los resultados clínicos de 4 parejas con varios ciclos previos de ICSI sin éxito, fallos recurrentes de implantación y ninguna otra causa evidente de infertilidad, que tras el cambio en el origen de espermatozoide (de eyaculado a testicular) mejoraron sus resultados reproductivos, obteniendo todas ellas un embarazo clínico con recién nacido vivo. A partir de entonces se han realizado tanto estudios retrospectivos como prospectivos con el ánimo de comprobar si dicha teoría se confirma.

Un primer estudio retrospectivo (Mehta et al., 2015) de 24 parejas con al menos un fallo previo de TRA y una FAE en el eyaculado mayor al 7% medida por TUNEL, tras cambiar el origen del espermatozoide para realizarse un nuevo tratamiento, la mitad de las parejas obtuvo un embarazo evolutivo que finalizó con el nacimiento de un niño sano. El nivel de FAE de los espermatozoides testiculares fue significativamente menor (5%) que los procedentes del eyaculado (24%) ($p=0,0013$). A su vez, un estudio de cohortes prospectivo comparó los resultados clínicos de 147 parejas que presentaban oligozoospermia y una FAE $>30\%$ en el semen eyaculado (medida mediante SCD) que se realizaron un ICSI con espermatozoides del eyaculado o con espermatozoides extraído del testículo (S. C. Esteves et al., 2015); de ellas, 81 parejas utilizaron espermatozoides testiculares (T-ICSI) y 91 parejas espermatozoides del eyaculado (E-ICSI). Tras la medición de la fragmentación, se encontró una diferencia significativa entre la FAE de los espermatozoides del testículo frente a los del eyaculado: 8,3% vs 40,7%, respectivamente. Aunque realizaran las transferencias en día 3 de desarrollo, hallaron una mejora importante de los resultados clínicos a pesar de una menor tasa de fecundación del grupo T-ICSI (56,1%) en comparación con el grupo E-ICSI (69,4%) ($p=0,0001$): la tasa de embarazo clínico fue 51,9% vs 40,2% ($p=0,13$) y de recién nacido vivo 46,7% vs 26,4% ($p=0,007$), respectivamente, un 20% mayor en el grupo testicular. La tasa de aborto también fue significativamente menor en este grupo, 10,0% vs 34,3% ($p=0,012$).

Posteriormente, el estudio prospectivo de Pabuccu (Pabuccu et al., 2017) reclutó a 85 parejas con dos fallos previos de ICSI y una FAE en el eyaculado $>30\%$ medida por TUNEL y las dividió en dos grupos: 31 parejas se realizaron un ciclo con espermatozoides

extraídos del testículo (T-ICSI) y 44 parejas con espermatozoides del eyaculado (E-ICSI). Reportó una mejora significativa en las tasas de gestación clínica (41,9% vs 20%, ($p=0,045$)) y de gestación evolutiva (38,7% vs 15%, ($p=0,023$)) por ciclo iniciado, y un descenso en la tasa de aborto (3,2% vs 17,5%) en el grupo testicular frente al eyaculado. Sin embargo, no reportaron la tasa de nacidos vivos. En un estudio de casos cruzados (Arafa et al., 2018) de 36 varones con una FAE media elevada (56,4% por SCD), se realizaron un segundo ciclo de ICSI usando espermatozoides obtenidos por TESA tras los malos resultados del primero usando semen eyaculado. El cambio del origen del espermatozoide mejoró significativamente la tasa de gestación clínica en un 20% (38,9% cuando usaron espermatozoides testiculares y un 13,5% con espermatozoides eyaculados), registrando un total de 17 nacimientos en los segundos ciclos (38,9%) mientras que en los primeros solo tres (8%) ($p<0,001$). Respecto al aborto, no se registró ninguno en los ciclos con espermatozoides testiculares y dos en los ciclos con espermatozoides del eyaculado.

La mejora de los resultados clínicos tras el cambio en el origen del espermatozoide fue también confirmada en una revisión sistemática y metaanálisis (S. C. Esteves, Roque, et al., 2017) en el que se incluyó un total de 4 estudios (507 ciclos de ICSI) de parejas normo- u oligozoospermicas que tenían un alto valor de FAE en el eyaculado. El análisis determinó que, aunque la tasa de fecundación no es mayor, se incrementa la tasa de gestación clínica junto con una disminución de la probabilidad de aborto, lo que se traduce en una tasa de recién nacido vivo 20% mayor en las parejas que usaron espermatozoides testiculares frente a las que usaron espermatozoides eyaculados: 46,9% vs 21,3%; $OR=2,58$ (1,54-4,35) ($p=0,0003$). Sin embargo, una revisión sistemática posterior que incluyó 4 estudios de diversa naturaleza (prospectivos y retrospectivos) y poblaciones (varones con mala calidad seminal con o sin diagnóstico de FAE) concluyó que la evidencia científica era insuficiente y de baja calidad como para recomendar de manera rutinaria la utilización de espermatozoides testiculares en pacientes con malos parámetros seminales en el eyaculado (Awaga et al., 2018).

En un siguiente estudio retrospectivo del 2019 (Herrero et al., 2019) hallaron una mejora significativa en aquellas parejas que cambiaron a espermatozoides testiculares cuando presentaban una FAE elevada y dos tratamientos previos de ICSI sin recién nacido vivo usando espermatozoides del eyaculado. En este caso, 77 parejas se sometieron a un ICSI con espermatozoides testiculares (T-ICSI) y 68 continuaron usando el semen eyaculado

(E-ICSI) como grupo control, estableciendo diferentes grupos de estudio en función del nivel de FAE. En primer lugar, cuando compararon simplemente el efecto del origen del gameto masculino, el grupo T-ICSI presentó una tasa de embarazo clínico tras la transferencia embrionaria en fresco significativamente superior al otro grupo (27,9% vs 10%), obteniendo este grupo una tasa acumulada de recién nacido vivo un 12% superior al tratamiento habitual, 23,4% (15/64) y 11,4% (7/61). Por otra parte, cuando compararon el nivel de FAE entre ambos tipos de espermatozoides mediante dos técnicas diferentes, TUNEL y la SCSA, encontraron siempre un nivel de fragmentación mayor en los espermatozoides testiculares, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando se subdividió a la población de estudio en función de si tenían la $FAE \geq 36\%$ medido por TUNEL, el grupo de estudio T-ICSI obtuvo tasas acumuladas de gestación y de nacidos vivos significativamente mejores que la E-ICSI (T-ICSI: 20% frente a E-ICSI: 0%; $p < 0,025$). Igualmente, los varones con elevada FAE por SCSA ($\geq 25\%$) obtuvieron mejores resultados reproductivos usando espermatozoides testiculares: T-ICSI: 21,7% vs. E-ICSI: 9,1% ($p < 0,01$). Cuando la población se subdividió en función de los parámetros seminales entre aquellos con parámetros alterados y normales según la OMS, los varones con oligoastenoteratozoospermia se beneficiaron del cambio a espermatozoides testiculares, ya que la tasa acumulada de recién nacido fue significativamente mejor (28%) que los que repitieron el tratamiento con espermatozoides eyaculados (6,7%) ($p < 0,01$); en cambio, esta mejora no se observó entre el grupo T-ICSI y E-ICSI de varones normozoospermicos.

También en 2019, Alharbi y colaboradores (Alharbi et al., 2019) realizaron un estudio retrospectivo comparativo de 52 parejas con FAE (establecida como moderada ($>15\%$) o elevada ($>30\%$) medida mediante el ensayo SCSA) que se sometieron a un ICSI con espermatozoides testiculares tras al menos un fallo de ICSI usando espermatozoides eyaculados (T-ICSI) con dos tipos de controles: 87 parejas con un primer ciclo de ICSI fallido con semen eyaculado que realizaron un segundo intento de nuevo (E-ICSI), y 48 parejas con FAE (moderada o alta) que se realizaron otro ciclo de ICSI con semen eyaculado tras al menos un fallo de ICSI previo (E-ICSI-alta FAE). En este caso, no encontraron una mejora significativa de los resultados clínicos en las parejas que usaron espermatozoides testiculares frente a los dos grupos control. La tasa de gestación clínica entre los T-ICSI y E-ICSI con una $FAE > 15\%$ fue 48,6% vs 48,2% ($p = 1,0$), con una tasa de aborto semejante (11,1% vs 11,1%; $p = 1,0$), respectivamente; en cambio, la tasa de gestación

clínica fue superior pero no estadísticamente significativa cuando se comparó con el grupo E-ICSI-alta FAE: 48,6% vs 38,7% ($p=0,41$), siendo el aborto superior en este último grupo, 11,1% vs 16,7% ($p=0,66$). Cuando compararon las parejas con una FAE>30%, la tasa de gestación clínica por transferencia fue superior en el grupo T-ICSI (48%) que en el E-ICSI-alta FAE (25%) ($p=0,25$), alcanzando una tasa de recién nacido vivo similar (29,2% vs 25%; $p=0,82$) tras dos abortos en el grupo T-ICSI. En cambio, cuando se compararon las tasas de gestación clínica, aborto y recién nacido vivo entre las parejas que tenían una FAE<30%, el grupo T-ICSI presentó mejores resultados que el E-ICSI-alta FAE, aunque no de manera estadísticamente significativa.

Paralelamente, el estudio prospectivo de Zhang et al., 2019 reclutó 102 parejas con FAE>30% en el eyaculado (por SCSA) que se sometieron a su primer ICSI con espermatozoides extraídos del testículo ($n=61$) o con espermatozoides del eyaculado ($n=41$). Aunque la tasa de fecundación fue similar para ambos, el grupo que utilizó espermatozoides testiculares obtuvo una mayor tasa de embarazo y de parto con recién nacido superior que aquellos que utilizaron semen eyaculado: 36% vs 14% de embarazo ($p>0,05$), y 38,5% vs 9,8% de parto con niño ($p=0,001$), respectivamente.

Tras la publicación de los diferentes estudios, dos grupos decidieron llevar a cabo una revisión sistemática tipo SWOT (del inglés *strengths, weaknesses, opportunities, and threats*), un ensayo que resume las principales ventajas y desventajas basadas en las evidencias científicas alcanzadas tras la aplicación esta estrategia clínica en varones no azospérmicos con elevada FAE en los espermatozoides del eyaculado. En ambas (Ambar et al., 2020; S. Esteves et al., 2018) se concluye que existe un menor grado de fragmentación en la cromatina de los espermatozoides testiculares que en los ya eyaculados, y que su uso parece mejorar los resultados reproductivos de las parejas que presentan alta FAE en el eyaculado incrementando las probabilidades de obtener un recién nacido. Sin embargo, admiten que la evidencia actual es de baja calidad debido a la falta de estudios randomizados controlados aleatorizados que confronten ambos tipos de tratamientos, y que los estudios publicados hasta la fecha presentan poblaciones heterogéneas además de pequeñas. También se debe considerar que la obtención de los espermatozoides testiculares es un proceso invasivo en el que se requiere cirugía, y que esta estrategia debería ser ofrecida como última opción tras el fracaso de otros métodos como reducir la FAE mediante cambios en los hábitos de vida o la toma de antioxidantes, o la aplicación de técnicas de selección espermática que reduzcan la FAE antes del

tratamiento. No obstante, hubo una presentación en el Congreso Europeo de Embriología Humana (ESHRE) donde se expusieron los resultados de un estudio controlado aleatorizado con 111 parejas que presentaban una FAE > 20% medida por TUNEL y mujeres menores de 35 años, que fueron aleatoriamente asignadas a realizarse un T-ICSI (n=53) o E-ICSI (n=58) (Hozain M. et al., 2018). Con un nivel de FAE similar en ambos tipos de espermatozoides, 26,7% en los testiculares y 23,8% en los eyaculados (p=0,7), la tasa de fecundación muy alta, aunque no estadísticamente significativa, en el grupo E-ICSI (77,2% frente a 62,9% en T-ICSI (p=0,1). La tasa de llegada a blasto fue significativamente más alta en el grupo E-ICSI (65,2% vs 38,0%; p=0,004) pero porque hubo más transferencias en día 3 en el grupo T-ICSI, lo que limita esta información. Sin embargo, apenas hubieron diferencias en los resultados clínicos, siendo la tasa de embarazo 50% y 51,0% en T-ICSI y E-ICSI (p=0,9), de gestación evolutiva 48% y 42,8% (p=0,5) y la tasa de aborto espontáneo 7,4% y 16%, respectivamente (p=0,16).

Por último, un reciente metaanálisis y revisión sistemática (Yu et al., 2021) incluyó 4 estudios de cohortes y 2 estudios de casos realizados entre 2005 y 2020 que evaluaron el efecto del uso de espermatozoides testiculares y del eyaculado en la ICSI en parejas con al menos un fallo de ICSI previo, con o sin prueba de FAE en el eyaculado. De esta manera se establecieron dos grupos diferentes. Tras el análisis de los resultados, aquellas parejas que presentaban una FAE elevada en el espermatozoides eyaculado (247 parejas y 2712 ovocitos inseminados), lograron tasas de embarazo clínico más altas con el espermatozoides testiculares que cuando se usaron espermatozoides eyaculados (43,4% vs 20,8%; con una OR agrupada de 2,87 (1,44-5,71) (p=0,003)), lo que se asoció a una mayor tasa de recién nacido en casa (38% vs 16% respectivamente), con una OR=3,24 (1,2-8,76) (p=0,02). En cambio, en las parejas que, o no se conocía el grado de FAE en el eyaculado o no fue un criterio para decidir cambiar el origen del espermatozoide, esta mejora no fue tan evidente.

Uso de espermatozoides testiculares en varones con infertilidad masculina severa

Igualmente, en las parejas que presentan infertilidad masculina severa, el cambio a espermatozoides testiculares en vez de utilizar el semen eyaculado podría mejorar los resultados clínicos de la TRA. Son numerosos los estudios que han evaluado el cambio de la fuente de espermatozoides para la ICSI cuando las parejas presentan malos

resultados reproductivos en sus tratamientos previos por una calidad seminal comprometida, sobre todo en el caso de varones con criptozoospermia, aunque los resultados son controvertidos (Abhyankar et al., 2016; Alharbi et al., 2020; Al-Malki et al., 2017; Ben-Ami et al., 2013; Kendall Rauchfuss et al., 2021; Negri et al., 2014).

En un primer pequeño estudio, 17 varones diagnosticados con criptozoospermia (recuento de espermatozoides menor a 100.000 por mililitro) se beneficiaron del cambio a espermatozoides de biopsia testicular tras el previo fracaso de su ciclo de ICSI con espermatozoides testiculares (Ben-Ami et al., 2013). Se realizaron un total de 116 ciclos, 68 con espermatozoides procedentes del eyaculado y 46 con espermatozoides obtenidos del testículo por TESE. Aunque no encontraron diferencias en la tasa de fecundación, se encontró una tasa de implantación y embarazo por transferencia significativamente mayor en los ciclos de ICSI con espermatozoides testiculares de los mismos pacientes: 20,7% vs. 5,7% ($p=0,003$) y 42,5% vs. 15,1% ($p=0,004$), respectivamente. La tasa de recién nacido vivo por transferencia fue significativamente mayor en los ciclos con espermatozoides testiculares, 27,5%, frente al 9,4% en los ICSI con espermatozoides eyaculados ($p=0,028$). Cuando evaluaron la calidad de los embriones (en días 2 y 3 del desarrollo embrionario) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. El análisis de regresión logística multivariante que realizaron reveló tres parámetros que influyen directamente sobre la probabilidad de embarazo en estas parejas: el origen testicular del espermatozoides (OR: 5.1 (1,8–14,8), el uso de espermatozoides móviles (OR: 12,9 (2,1–79,1)), y la edad de la mujer (OR: 0,83 (0,7–0,9)).

En otro estudio consecutivo, (Negri et al., 2014) se evaluó un total de 231 parejas con infertilidad masculina por necrozoospermia (determinada como una vitalidad espermática entre el 5-45%) que se realizaron un total de 342 ciclos con espermatozoides eyaculados y 182 ciclos de ICSI con espermatozoides obtenidos por TESE (65% de ellas se habían realizado un tratamiento previo con semen eyaculado). Los autores hallaron resultados significativamente superiores por ciclo en las parejas que utilizaron espermatozoides testiculares comparado con aquellas que continuaron utilizando espermatozoides eyaculados en términos de tasa de implantación (36,8% vs 19,9%, $p=0,0001$), en la tasa de embarazo 23,7% vs 12,7% ($p=0,0001$), alcanzando una tasa de recién nacido vivo por ciclo de 28,6% y 13,7% ($p=0,0001$), respectivamente. La tasa acumulada de partos por pareja fue del 28,3% en los ciclos de ICSI con espermatozoides eyaculados frente al 44,7% en los ciclos de TESE-ICSI ($p=0,005$).

Sin embargo, se encuentran resultados controvertidos entre los metaanálisis publicados. En el metaanálisis de Abhyankar y colaboradores, en el que incluyeron 5 estudios de cohortes con un total de 272 ciclos de ICSI y 4.596 ovocitos inseminados (Abhyankar et al., 2016), no encontraron diferencias en la tasa de fecundación (Riesgo relativo [RR]: 0,91(0,78-1,06)) ni en la tasa de embarazo tras la ICSI con espermatozoides testiculares frente a los ciclos en los que usaron espermatozoides del eyaculado en varones con criptozoospermia (RR: 0,53 (0,19-1,42)). En cambio, Kang (Kang et al., 2018) que incluyó 6 estudios y un mayor número de ciclos (761 ciclos de 578 pacientes) encontró que el uso de espermatozoides testiculares frescos para la ICSI favorece la tasa de blastocistos de buena calidad (RR=1,17 (1,05-1,30); $p=0,005$), la tasa de implantación (RR=1,52 (1,02-2,26); $p=0,04$) y la tasa de embarazo (RR=1,74 (1,20-2,52), $p=0,004$) en varones con criptozoospermia. En otro metaanálisis de 2018 (331 pacientes, 479 ciclos de ICSI), Ku y colaboradores (Ku et al., 2018) no hallaron una mejora significativa de los resultados clínicos de pacientes con criptozoospermia tras el ICSI con espermatozoides del testículo en vez de con eyaculados. Encontraron una mayor tasa de recién nacido por transferencia (RR=1,72 (1,21-2,44), $p=0,002$), y por ciclo de ICSI (RR=1,77 (1,28-2,44), sobre todo si la pareja es joven (RR= 1,93 (1,11-3,34; $p=0,02$), mientras que la tasa de aborto se mantuvo similar entre ambos tipos de tratamientos (RR= 1,06 (0,48-2,35), $p=0,88$). La falta de concordancia entre estudios de tipo revisiones y/o metaanálisis puede radicar en los diferentes criterios de inclusión establecidos por poblaciones heterogéneas no comparables.

Posteriormente, en un estudio retrospectivo (Alharbi et al., 2020) compararon los resultados clínicos de 88 varones con diferentes grados de oligozoospermia severa y criptozoospermia (con concentraciones espermáticas menores a 5 millones/mililitro) que se sometieron a TESA para realizar la ICSI. En general, obtuvieron una tasa de embarazo por transferencia embrionaria del 46% (26/57), pero cuando se dividió a la población de estudio en función de la concentración espermática, hallaron que los varones con criptozoospermia (11 en total) obtenían los peores resultados reproductivos, una peor tasa de recuperación espermática por TESA y ninguno obtuvo embarazo, al contrario que los demás varones que obtuvieron resultados clínicos aceptables. En cambio, los resultados clínicos de varones con diagnóstico de oligozoospermia tras el cambio a espermatozoides testiculares no mejoraron (Kendall Rauchfuss et al., 2021). En este estudio compararon 32 parejas que utilizaron espermatozoides eyaculados y 19 que utilizaron

espermatozoides testiculares tras TESE para la ICSI. La tasa de fecundación fue un 20% menor en el grupo que usó espermatozoides testiculares (60% vs 80%, $p=0,017$), obteniendo un número medio de blastocistos inferior (2 vs 4, $p=0,012$). Tras la transferencia, el grupo eyaculado obtuvo una mayor tasa de embarazo y recién nacido vivo, y una menor tasa de aborto, aunque estas no fueron estadísticamente significativas. Tras el ajuste a potenciales confundidores, la probabilidad de recién nacido fue tres veces superior con el uso de espermatozoides eyaculados ($OR=3,2$ (0,79-12,94)). Sin embargo, cabe descartar que el criterio de inclusión fue tener un recuento total de espermatozoides móviles menor a 25 millones, y no presentaban ningún fallo previo de FIV ni tampoco se evaluó la FAE como para justificar esta intervención.

Desventajas de la extracción quirúrgica de espermatozoides testiculares

Aunque la extracción quirúrgica de espermatozoides del testículo es una técnica de rutina clínica desde hace años y se ha demostrado su seguridad y beneficios, no se puede dejar de lado que es una técnica invasiva no exenta de riesgos para el paciente. Este procedimiento puede estar asociado a complicaciones durante o después de la intervención, como dolor, inflamación, hematomas e infecciones (Zini et al., 2017), y que si no se resuelven de forma correcta pueden afectar a la homeostasis testicular y derivar en un deterioro de la función testicular o en hipogonadismo (Eliveld et al., 2018). Si bien la tasa de recuperación espermática tras la biopsia testicular en el caso de varones no azoospermicos es altamente efectiva porque su testículo produce células de manera más o menos constante (S. C. Esteves et al., 2023), se debe informar al paciente de los riesgos asociados a la intervención, lo que podría condicionar la decisión de realizar un tratamiento con espermatozoides testiculares si tiene en el eyaculado.

Igualmente, el uso de espermatozoides testiculares se ha asociado con un riesgo incrementado de aneuploidías espermáticas que puede agravarse en casos de infertilidad masculina severa (Bernardini et al., 2000; Gianaroli et al., 2005; Rodrigo et al., 2019). Sin embargo, la mayor parte de los estudios han evaluado la tasa de aneuploidías espermáticas en varones con azoospermia. Por ejemplo, un estudio realizado en 2001 por (Levron et al., 2001) con 28 varones infértiles mostró mayores tasas de aneuploidía en espermatozoides testiculares de pacientes azoospermicos no obstructivos (19,6%) que en sus homólogos obstructivos (8,2%) y en espermatozoides eyaculados de sujetos con oligozoospermia (13,0%). En otro estudio pequeño con 12 pacientes (G. D. Palermo et

al., 2002) encontraron tasas de aneuploidía del 11,4% y el 1,8% ($p=0,0001$) en espermatozoides testiculares de pacientes azoospermicos no obstructivos y obstructivos, respectivamente. Vozdova et al., 2012 que evaluaron 17 varones con azoospermia no obstructiva y 10 controles fértiles, mostraron que la frecuencia global de disomía y diploidía en los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y era del 2,86% en los espermatozoides testiculares de los pacientes con azoospermia y del 0,92% ($p<0,05$) en el eyaculado de controles fértiles.

Posteriormente, se evaluaron por primera vez las tasas de aneuploidía espermática (mediante FISH – Fluorescence in situ Hybridization) en varones no azoospermicos con elevada FAE en el eyaculado (Moskovtsev et al., 2012). Aunque la muestra fue pequeña (el estudio se realizó en 8 varones), la tasas de aneuploidía fueron mayores en los espermatozoides testiculares que en los procedentes del eyaculado ($12,4 \pm 3,7\%$ frente a $5,7 \pm 1,2\%$; $p<0,05$). Sin embargo, también constataron que el daño del ADN espermático (evaluado mediante el ensayo TUNEL) era tres veces menor en los espermatozoides testiculares que en los eyaculados ($13,3\% \pm 7,3$ frente a $39,7\% \pm 14,8$). En cambio, en un estudio más reciente se obtuvieron resultados contrarios (Cheung S. et al., 2019) cuando compararon las tasas de aneuploidías entre los espermatozoides testiculares y eyaculados mediante la técnica FISH (nueve cromosomas) y secuenciación de genoma completo en una población de 93 sujetos (azoospermicos, controles fértiles y con elevada FAE en el eyaculado). Los autores revelaron tasas globales de aneuploidía por FISH del 3,6% en muestras eyaculadas, del 1,2% en muestras epididimarias y del 1,1% en muestras testiculares. La secuenciación del exoma completo mostró tasas de aneuploidía más altas en los espermatozoides eyaculados (11,1%) que en los epididimarios (1,8%) y los testiculares (1,5%) ($p<0,0001$). Asimismo, cuando evaluaron las muestras de semen eyaculado con los espermatozoides testiculares del mismo sujeto con elevada FAE descubrieron que la tasa de aneuploidía era inferior en los testiculares que en los del eyaculado, 1,3% frente a 8,4% ($p=0,02$).

Sin embargo, ninguno de los estudios que han investigado el uso de espermatozoides testiculares en varones con elevada FAE e infertilidad masculina severa han estimado el impacto que pudieran tener sobre la euploidía de los embriones resultantes. A raíz de la información disponible, su uso podría aumentar las probabilidades de obtener embriones aneuploides y un detrimento de las probabilidades de embarazo y de recién nacido sano. Solo se encuentra una comunicación presentada en el Congreso ESHRE, en el que el

equipo analizó un total de 940 biopsias de trofoectodermo (TE) de 362 parejas que presentaban una FAE>30%, de las cuales 280 se realizaron un tratamiento con semen eyaculado propio (764 embriones) y 82 parejas con espermatozoides testiculares (176 embriones). Hallaron una tasa de euploidía por ovocito metafase II utilizado comparable entre ambos grupos, 18,7% vs 18,3%, respectivamente (Figueira R CJ et al., 2019). Sin embargo, el análisis ajustado posterior reveló que el factor más determinante de la euploidía del blastocisto era la edad de la mujer y no la edad del varón o su nivel de FAE.

Es notable la falta de evidencia científica que afirme que el uso de espermatozoides testiculares en estos varones no supone un mayor riesgo de tener descendencia con anomalías cromosómicas y por tanto, se asegure la inocuidad de esta estrategia. Se requieren realizar más estudios prospectivos y controlados que puedan confirmar esta primera evidencia para poder aconsejar esta estrategia clínica a estas parejas que deseen lograr un embarazo y un bebé sano en casa.

HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis para esta tesis es que, en los varones con elevada FAE en el semen eyaculado, cuyos tratamientos previos de FIV mediante ICSI han sido fallidos o presentan oligozoospermia severa logran una mejora en los resultados clínicos cuando se utilizan espermatozoides testiculares en lugar de los presentes en el eyaculado, lo que permite obtener unas mayores tasas de recién nacido vivo por tratamiento. Dicha mejora en los resultados clínicos surgiría del aumento en la proporción de embriones de buena calidad y euploides disponibles para transferir en estas parejas.

Esto justificaría clínicamente la recomendación de realizar una biopsia testicular en varones no azoospermicos con el objetivo de obtener espermatozoides que presentan una menor fragmentación del ADN y aneuploidías cromosómicas, lo cual se reflejaría en un mayor número de embriones disponibles por pareja por tratamiento en comparación con los embriones procedentes de ciclos con espermatozoides del eyaculado.

OBJETIVOS

Objetivo principal

El objetivo principal de esta tesis es demostrar un aumento del 15% de embriones cromosómicamente normales disponibles para los tratamientos de reproducción asistida gracias al uso de espermatozoides testiculares en comparación con espermatozoides disponibles en el eyaculado, en varones con elevada FAE y oligozoospermia severa o fallo previo de ICSI.

Objetivos secundarios

- Demostrar diferencias en el índice de FAE entre los espermatozoides procedentes del eyaculado y de los espermatozoides de la biopsia testicular.
- Demostrar diferencias en los parámetros clásicos de calidad embrionaria, medidos en los distintos días de desarrollo embrionario (día 3, día 5 y día 6), entre los embriones procedentes de espermatozoides del eyaculado y los de biopsia testicular.
- Demostrar diferencias en la tasa de aneuploidías presente entre los espermatozoides de eyaculado y los espermatozoides de biopsia testicular.
- Demostrar diferencias en las distintas medidas de éxito reproductivo (fecundación, gestación, aborto y parto con recién nacido vivo por transferencia embrionaria) con el uso de espermatozoides de eyaculado y de espermatozoides de biopsia testicular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder alcanzar los objetivos de este estudio se llevaron a cabo tres subestudios de diferente diseño: un análisis retrospectivo con los datos clínicos existentes, un análisis prospectivo aleatorizado controlado con sujetos pacientes, y por último un metaanálisis con los resultados de estudios ya publicados. Los resultados obtenidos se presentan de manera independiente entre sí.

Estudio retrospectivo

Diseño de estudio

Se realizó un análisis retrospectivo de los datos clínicos de 27 parejas que tras un ciclo fallido de ICSI (entendido como el fracaso en la obtención de un recién nacido tras la transferencia de todos los embriones obtenidos), realizado con ovocitos propios y espermatozoides del eyaculado (E-ICSI), se realizaron un segundo ciclo de ICSI con ovocitos propios y espermatozoides procedentes del testículo (T-ICSI). En ambos ciclos se realizó un análisis PGT-A a los embriones generados por factor masculino y/o fallos de implantación previos, y/o abortos.

El periodo de estudio comprendió desde enero del 2000 a noviembre 2020. Se tuvieron en cuenta para el análisis los dos ciclos de ICSI más cercanos en el tiempo para estandarizar y controlar las características de los pacientes.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético para la Investigación del Hospital Universitario y Politécnico la Fe con el código 2011-FIVI-096-NG.

Población de estudio

Se seleccionaron parejas con al menos un fallo de ICSI realizado con espermatozoides del eyaculado y ovocitos propios (E-ICSI) y que se realizaron posteriormente un ciclo de ICSI con espermatozoides procedentes del testículo obtenidos mediante TESE (T-ICSI).

Criterios de inclusión y exclusión

Como criterios de inclusión para participar en el estudio:

- Parejas con un ciclo de ICSI previo fallido (aquel en el que no obtuvieron embriones, no gestaron o no consiguieron un recién nacido) utilizando espermatozoides del eyaculado y ovocitos propios.
- Parejas que se realizaron un ciclo de ICSI con espermatozoides testiculares obtenidos mediante TESE y ovocitos propios.
- En ambos ciclos de ICSI, se tuvo que realizar PGT-A a los embriones obtenidos.

Quedaron excluidas del estudio parejas con:

- Varones con azoospermia (obstruktiva y no obstruktiva).
- Si la pareja cambia a ovocitos donados en su siguiente tratamiento.
- Ciclos de PGT para enfermedades monogénicas o alteraciones cromosómicas estructurales.
- Ciclos de ICSI con ovocitos donados.
- Ciclos mixtos, FIV-ICSI.

Resultados clínicos evaluados

La variable principal del estudio fue la tasa de aneuploidía embrionaria, calculada como la proporción de embriones analizados mediante PGT-A con diagnóstico aneuploide en función del número total de ovocitos inseminados. También se calculó en función del número de ovocitos correctamente fecundados o cigotos (2PN) y por el número total de blastocistos biopsiados.

Otras variables analizadas fueron la tasa de llegada a blastocisto calculada como el número de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto en día 5 de desarrollo dividido por el número total de ovocitos inseminados y por el número de cigotos 2PN. La calidad embrionaria se evaluó en día 5/6 de desarrollo embrionario según los criterios morfológicos establecidos por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) (Asebir, 2015). Estos fueron: i) el grado de expansión del blastocisto (cavitado, expandido, eclosionando o eclosionado); ii) calidad del trofotodermo (definida como A, B, C o D) y calidad de la masa celular interna (MCI) (definida como A, B, C o D) (Figura suplementaria 3). Para calcular la tasa de blastocistos de buena calidad fue la proporción de blastocistos de calidad A+B por el número total de ovocitos inseminados, por el número de ovocitos número de ovocitos 2PN y por el número total de total de embriones en estadio de blastocisto.

Los resultados clínicos fueron tasa de implantación, tasa de gestación bioquímica (resultado de niveles séricos de la hormona gonadotropina coriónica humana (β -hCG) superiores a 10 UI/litro diez días después de la transferencia), tasa de gestación clínica (detección de saco en la cavidad uterina y latido cardíaco a las 7 semanas de gestación), tasa de gestación evolutiva (confirmación de un embarazo en progreso superior a las 12

semanas de gestación), tasa de aborto (pérdida o detención de la gestación tras confirmar la presencia de saco) y la tasa de recién nacido. Estos resultados reproductivos están calculados por ciclo de T-ICSI.

Análisis estadístico

Todos los datos clínicos relacionados con las características de los pacientes y sus tratamientos se exportaron de la base de datos electrónica del grupo IVIRMA España.

De las variables exportadas, las de tipo continuo se presentaron como media e intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Las variables categóricas se describieron como proporción de casos (%) con su correspondiente IC del 95%. Las diferencias entre dos grupos se compararon mediante la prueba t de Student de dos colas para datos con distribución normal y la prueba Chi-cuadrado de Pearson para datos categóricos. Los datos se analizaron con el programa informático R (versión 4.02). R Core Team (2020). Fundación R para la Computación Estadística, Viena, Austria). A Un valor $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Estudio prospectivo

Diseño del estudio

Se trata de un estudio prospectivo de cohortes randomizado. La randomización es dada porque los ovocitos de la paciente fueron asignados de manera aleatoria a uno de los dos grupos de estudio para ser microinyectados o por un espermatozoide procedente del eyaculado o por uno de origen testicular. De esta manera, se establecieron dos grupos de estudio intra-paciente: ovocitos inseminados por espermatozoides eyaculados (E-ICSI) y ovocitos inseminados por espermatozoides testiculares (T-ICSI).

Las parejas que cumplieron en primera instancia los criterios de inclusión referidos a la calidad del semen (con diagnóstico de oligozoospermia severa) o por tratamientos previos de ICSI fallidos, y cuyo nuevo tratamiento se realiza con gametos propios se les ofreció participar. Posteriormente, se procedió a la evaluación del nivel de FAE de la muestra de semen eyaculado en fresco para determinar el grado de rotura de la cromatina mediante la técnica SCD. Solo aquellos varones que presentaron una tasa de espermatozoides con la cromatina dañada en el semen eyaculado superior al 30% se incluyeron definitivamente en el estudio.

Ambas partes de la pareja firmaron los consentimientos informados del estudio y se estableció su tratamiento de reproducción asistida mediante la técnica ICSI-PGT-A: la programación de la biopsia testicular para la obtención de estos espermatozoides y el inicio de la estimulación ovárica de la mujer.

El mismo día de la realización de la biopsia testicular, el varón depositó previamente a la intervención quirúrgica una muestra de semen eyaculado que fue crioconservada. Ambas muestras, la de semen eyaculado y la de espermatozoides testiculares, estuvieron crioconservadas hasta el día de la inseminación de los ovocitos mediante la ICSI (Figura suplementaria 4).

Población de estudio

La población de referencia de estudio son las parejas que acuden al Instituto Valenciano de Infertilidad localizado en Murcia para realizarse un tratamiento de reproducción asistida con gametos propios mediante la técnica ICSI. Todas las parejas participantes en el estudio expresaron su voluntad de participar mediante la firma de los consentimientos informados.

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia con el código 1802-FIVI-015-NG. Este estudio se registró en Clinical Trials con el código NCT04795440.

Criterios de inclusión y exclusión

Como criterios de inclusión para participar en el estudio:

- Varones con oligozoospermia severa (<5 millones de espermatozoides) en el eyaculado en fresco;
- O varones sin diagnóstico de oligozoospermia, pero que presentan un fallo previo de ICSI con su pareja, entendido como, tras la inseminación de al menos seis ovocitos, no se obtienen cigotos por un fallo de fecundación, no se obtienen embriones para transferir por bloqueo en el desarrollo embrionario o no se obtiene embarazo después de la transferencia de todos los embriones obtenidos.
- Mujeres con una reserva ovárica adecuada, con niveles séricos de la hormona anti-mulleriana (AMH) >2 ng/ml o un recuento de folículos antrales (RFA) > 6.
- Varones con elevada fragmentación del ADN espermático (FAE >30%) en el eyaculado en fresco.

Quedaron excluidas del estudio parejas con:

- Cariotipo del paciente anormal.
- Presencia de microdeleciones en el cromosoma Y conocidas.
- Portadores conocidos de mutaciones en el gen de la fibrosis quística.
- Presencia de varicocele.
- Edad de la mujer >38 años.
- Presencia de patología uterina que pudiera condicionar los resultados reproductivos (miomas, malformaciones uterinas que condicionen la gestación).

Prueba de fragmentación del ADN espermático

El análisis de la integridad del ADN se realizó mediante SCD con el kit de diagnóstico Halosperm® G2 de Halotech DNA© (Madrid, España). La determinación del nivel de la FAE se realizó inmediatamente después de la obtención de la muestra seminal, con los espermatozoides intactos sin fijar (obtenidos de muestras seminales frescas y de las muestras congeladas).

Para la determinación de la FAE, en primer lugar, se preparó el gel de agarosa sobre el cual se realiza la determinación. Para ello, se introdujo el tubo con agarosa disponible en el kit en un baño maría a 95-100°C de temperatura para su licuefacción. Con la agarosa fundida se alícuota 100 µL de agarosa en 10 tubos Eppendorf, siempre trabajando con ellos a 37°C. Mientras, las soluciones 1 (Denaturant Agent, agente desnaturalizante) y 2 (Lysis Solution, solución lisante) se mantienen a temperatura ambiente.

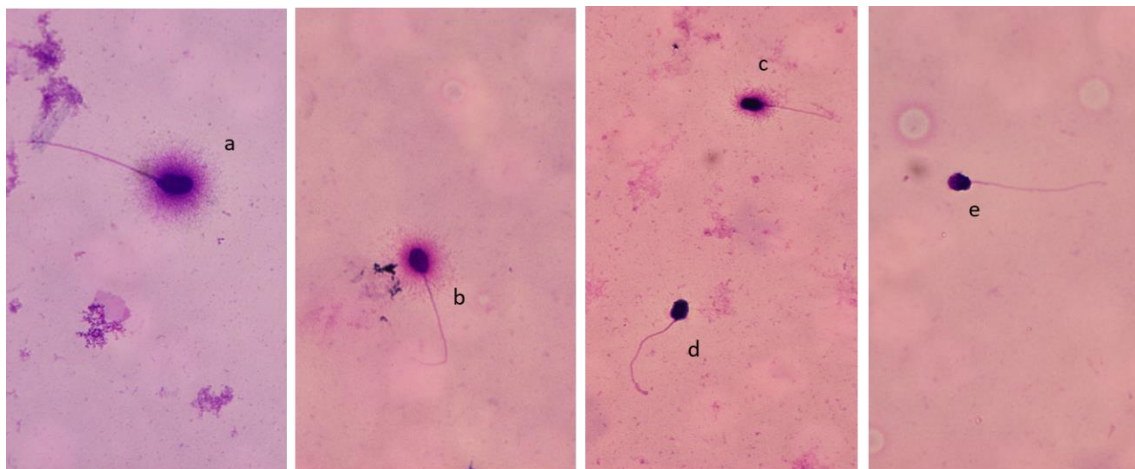
Las muestras de semen deben tener una máxima concentración de 20 millones de espermatozoides por mililitro. En el caso de que tuvieran una concentración mayor, se diluyeron en PBS (tampón fosfato salino). Inmediatamente después, se transfirieron 50 µl de la muestra de espermatozoides al tubo Eppendorf con agarosa y se mezcló suavemente, evitando la formación de burbujas. A continuación, se colocó una gota de 8 µl de la suspensión celular en cada uno de los dos pocillos de los portaobjetos específicos del kit y se cubrieron con un portaobjetos. Los portaobjetos con las muestras se colocaron sobre una superficie fría y se mantuvieron a 4°C en el frigorífico durante 5 minutos para su solidificación.

Posteriormente, se retiraron los cubreobjetos y se trabaja con las muestras a temperatura ambiente (22°C). Con el portaobjetos en horizontal se aplicó la solución 1, desnaturalizante, solamente en uno de los dos pocillos, ya que el otro ejerce como control

del test. La solución se incubó durante 7 minutos cubriendo todo el pocillo. Pasado ese tiempo, se retiró el exceso de reactivo inclinando el portaobjetos hasta su completo secado. A continuación, se aplicó la solución 2, lisante, sobre el pocillo de la muestra asegurando su completa sumersión. Se incubó durante 20 minutos y, pasado el tiempo se retiró el exceso de reactivo inclinando y dejando que se deslice.

El portaobjetos se lavó durante 5 minutos con abundante agua destilada, dejándolo inclinado hasta su completo secado. Después, se aplicó etanol al 70% durante 2 minutos, se escurrió y se volvió a lavar con etanol al 100% durante otros 2 minutos. Pasado ese tiempo, se escurrió y se secó el portaobjetos. Seguidamente, se aplicó la solución 3, solución tinción de eosina, en ambos pocillos quedando totalmente sumergidos durante 7 minutos. De nuevo, se retiró la tinción hasta completar su secado, y se añadió la última solución 4, solución tinción de tiazina, sobre los dos pocillos dejándolos 7 minutos. A continuación, se retiró el tinte inclinandolo y se dejó secar a temperatura ambiente.

Figura 2. Prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD) para evaluar la FAE en los espermatozoides (Halosperm® G2 de Halotech DNA, España).



Los espermatozoides con la cromatina intacta presentan un halo de dispersión alrededor de la cabeza (a, b, c). En cambio, los espermatozoides con la cromatina fragmentada no presentan dicho halo (d y e).

Los espermatozoides con la cromatina dañada se visualizan sin halo o con el halo muy pequeño (su anchura es similar o inferior a 1/3 del diámetro del núcleo) respecto a los que presentan el ADN intacto, en los que se percibe un halo cuya la anchura es similar o superior al diámetro del núcleo (Figura 2). Para calcular el porcentaje de fragmentación de ADN se contó el número de espermatozoides (con halo grande, mediano, o pequeño, sin halo y degradado) sobre un total de 300 espermatozoides por portaobjetos. Los

espermatozoides sin halo corresponderían a aquellos con la cromatina dañada. En el caso de no encontrarse esa cantidad, se cuantificó los que hubiera en la totalidad del portaobjetos.

Biopsia de testículo

La extracción de espermatozoides testiculares se realizó mediante TESE. En primer lugar, los pacientes se sometieron a sedación para la intervención y para ello se bloqueó el cordón espermático con 2% de mepivacaina. Después, se procedió a abrir la piel escrotal y la túnica vaginalis del testículo, y se realizó una pequeña incisión en una zona de la túnica albugínea para extruir el tejido testicular hacia fuera. Esta pieza de tejido que contiene túbulos seminíferos se extirpa y se coloca en una placa petri con medio Fert (Origio, CooperSurgical, Ballerup, Dinamarca) para su evaluación en el laboratorio adjunto. El tejido fue lacerado mecánicamente con portaobjetos estériles para exponer el contenido de los túbulos seminíferos al exterior y localizar los espermatozoides.

La presencia de células espermáticas fue examinada bajo microscopio invertido a un aumento de 400X. Si se encontraba un número adecuado de espermatozoides móviles, la intervención se finaliza. De no ser así, se obtiene otra pieza de tejido de otra área testicular siguiendo el mismo procedimiento. La confirmación de la existencia de espermatozoides móviles se realizó con la adición de pentoxifilina tras centrifugado. Tras encontrar un número adecuado de espermatozoides, se procedió inmediatamente a la congelación de la muestra.

Recogida de muestras de semen eyaculado y su análisis

Para este estudio se requirió el análisis de muestras de semen eyaculado en fresco, tanto para la medición de la FAE como para su evaluación mediante el espermograma siguiendo los criterios del Manual del Análisis del Semen de la OMS de la 5ª Edición (World Health Organization, 2010).

Para obtener la muestra, el paciente depositó una muestra de semen eyaculado obtenida por masturbación tras un periodo de abstinencia de dos a cinco días en un recipiente estéril, previo lavado aséptico de manos y genitales. Estas muestras se obtuvieron en una sala habilitada para ello y a continuación se trasladaron al laboratorio de andrología para su análisis en los siguientes 60 minutos.

Los recipientes con la muestra seminal se dejaron durante un periodo de 10-15 minutos en un incubador a 37°C y 6% de CO₂ hasta su total licuefacción. Una vez alcanzada la

licuefacción, se valoraron las características macroscópicas y microscópicas de las mismas.

El análisis macroscópico consiste en la valoración del aspecto, color, grumosidad y viscosidad, el pH y el volumen total.

Para el análisis microscópico se utilizó una gota de 10 μ L de muestra seminal en una cámara de recuento Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) y un microscopio óptico de contraste de fases a un aumento de 200X. Se evaluó la concentración espermática, la motilidad, la morfología, así como la presencia de otros elementos celulares (leucocitos y/o células germinales inmaduras) y detritos, anticuerpos antiespermatozoides (aglutinación), y vitalidad.

La determinación de la concentración de espermatozoides por millones/ml se efectúa contando el número de espermatozoides que hay en cada fila de 10 cuadrados, realizando un conteo de hasta 200 espermatozoides y dividiendo por el número de filas contadas. Este recuento se efectúa dos veces y se hace la media. El ensayo de la motilidad se lleva a cabo mediante el conteo y evaluación del tipo de movilidad de 200 espermatozoides móviles e inmóviles observados al azar. Según la clasificación de la OMS (World Health Organization, 2010), las células espermáticas se clasifican en función de su motilidad en: espermatozoides progresivos, aquellos con un movimiento activo de forma rectilínea o curvilínea amplia sin tener en cuenta la velocidad; los espermatozoides no progresivos, espermatozoides con patrones de movimiento que no tienen progresión; y los espermatozoides inmóviles, aquellos que no presentan ningún tipo de movimiento.

La morfología de los espermatozoides se realiza mediante la tinción de Papanicolau modificada, tal y como recomienda la OMS. Esta técnica permite distinguir en la cabeza la región acrosomal y postacrosomal, la pieza media y la cola. Para ello, se deposita una gota en un portaobjetos y se extiende a lo largo de su superficie mediante arrastre. Tras su secado, se introduce en alcohol al 70% y se deja secar al aire para su fijación. Posteriormente, se introduce el portaobjetos con la extensión en eosina (1 minuto) y después en hematoxilina (1 minuto). La extensión se evaluó al microscopio óptico a un aumento de 100X. Se contaron las alteraciones de cabeza, cuello y cola y se estableció el grado de normalidad siguiendo los criterios de Kruger.

Parte de la muestra seminal (mínimo 0,5 ml) se utilizó para el análisis de la FAE mediante la prueba SCD.

Criopreservación de las muestras

El mismo día en el que se programó la biopsia testicular, el paciente dejó previamente una muestra de semen eyaculado. Esta muestra se analizó para conocer los parámetros seminales de partida.

Para el procedimiento de congelación, una vez conocido el volumen de muestra seminal dada, se le añadió medio de congelación (SpermFreeze; FertiPro, Beernem, Bélgica) en proporción 1:0,7 y se dejó incubar 15 minutos. Posteriormente, las muestras procesadas se congelaron en pequeñas pastillas o píldoras utilizando una superficie de hielo seco durante aproximadamente 1 minuto y luego se transfirieron a criotubos etiquetados que se enfriaron con vapores de nitrógeno hasta su completa congelación.

Las muestras de tejido testicular con espermatozoides obtenidas tras la biopsia testicular también se criopreservaron utilizando el mismo medio y protocolo de congelación. Una vez las muestras estuvieran congeladas, se depositaron en tanques de nitrógeno hasta su utilización el día del tratamiento.

Estimulación y punción ovárica

A las pacientes se les programó la estimulación ovárica controlada para conseguir un buen número de folículos antrales desarrollados. Todas ellas iniciaron la estimulación en la fase folicular del ciclo, entre el primer y tercer día.

Se utilizó el protocolo con antagonistas de la GnRH, en el cual se administra desde el inicio una dosis subcutánea de 112-225 UI/día de FSH recombinante (Bemfola 225 ®; Gedeon Richter Plc, Budapest, Hungría; Bemfola 150®; Gedeon Richter Plc, Budapest, Hungría) y 50-75 UI/día de HMG subcutánea (Menopur 75 ®; Ferring GmbH, Kiel, Alemania; Menopur 600®; Ferring GmbH, Kiel, Alemania). Cuando hay folículos con un tamaño de 14 mm se administra una dosis subcutánea diaria de 0.25 de GnRH-a (Orgalutran 0.25®; Organon, Dublín, Irlanda) durante 3-4 días, para lograr que al menos 3 o más folículos alcanzan un tamaño de ≥ 18 mm. La maduración final de los ovocitos se logra con la administración subcutánea de hCG (Ovitrelle ®; Merk, Londres, Reino Unido) o mediante un bolo de agonistas o doble trigger con GnRH-a (Orgalutran 0.25®; Organon, Dublín, Irlanda). A las 36 horas de la administración de la hCG y/o del bolo se realizó la punción folicular bajo sedación y ecografía guiada. Los folículos aspirados y su contenido se vertieron a los tubos atemperados manteniéndolos siempre a 37°C mediante bloques térmicos calefactados.

En el laboratorio, el líquido folicular se vertió en placas petri precalentadas para buscar los complejos cúmulo-ovocito (COC) a la lupa (8-10X), conformados por las células de la granulosa que rodean al ovocito. Una vez recolectados, se depositaron en placas con medio de lavado (Origio, CooperSurgical, Ballerup, Dinamarca) a la espera de que la aspiración folicular finalice. Si los COC eran grandes, estos se recortaron mediante el uso de dos agujas de inyección. Finalmente, todos los ovocitos recolectados se cultivan en una placa con medio atemperado (Origio, CooperSurgical, Ballerup, Dinamarca) en un incubador a 5,5% CO₂ y 37°C hasta su posterior decumulación.

La decumulación (o denudación) de los ovocitos se realiza mediante acción química-mecánica con ayuda de la enzima hialuronidasa (Hyaluronidase in FertiCult (™) Flushing medium; FertiPro, Beernem, Bélgica). Consiste en la eliminación de las células de la granulosa que rodean al ovocito con el objetivo de conocer su grado de maduración y si es apto para su inseminación. Para ello, en una gota de 50µL medio Fertilization (Origio, CooperSurgical, Ballerup, Dinamarca) se añade hialuronidasa a una concentración del 50% y posteriormente los COC; con movimientos de pipeteado se disgregan las células de la granulosa. A continuación, se pasaron los complejos ovocitarios a otras gotas de 50µL cultivo sin enzima y por acción mecánica al pipetear con capilares de calibre más pequeño se disgregan las últimas células que rodean al ovocito. En este momento se puede observar el estado de maduración del ovocito: vesícula germinal, ovocito en metafase I (MI) u ovocito en metafase II (MII), que se caracterizan por la presencia de un corpúsculo polar y un citoplasma liso. Solo estos últimos son los idóneos para la inseminación mediante la técnica ICSI.

Capacitación muestras seminales

Las muestras seminales utilizadas para este estudio, tanto las de eyaculado como las testiculares, se procesaron mediante lavado seminal tras su descongelación debido a las características límites en los parámetros seminales. Para cada inseminación se descongelaron entre 8-9 píldoras (de un volumen de 30-40 µL aproximadamente) de cada tipo de muestra. Mediante la técnica de lavado, se elimina el plasma seminal y el medio de congelación utilizado añadiendo medio de lavado (Sperm Wash ORIGIO; CooperSurgical, Ballerup, Dinamarca), separando así los espermatozoides aptos para la inseminación de los ovocitos.

Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)

La inseminación de los ovocitos se realizó mediante la técnica ICSI. Todos los ovocitos de las pacientes de este estudio se microinyectaron en fresco a las 4 horas de su obtención utilizando un microscopio a un aumento de 400X. Los ovocitos fueron aleatoriamente inseminados por los dos tipos de espermatozoides gracias a una tabla de randomización que solo conocía la persona que realizaba la ICSI. De esta manera, se asignó al azar qué tipo de espermatozoide insemina a cada ovocito hasta completar toda la cohorte ovocitaria (Figura suplementaria 4).

Para ello, en una placa con gotas de 10 μ L de medio (ORIGIO Handling; CooperSurgical, Ballerup, Dinamarca) cubiertas con aceite mineral de alta densidad se colocan los ovocitos, y en una gota central se ponen sin diluir en medio 10 μ L de Polivinilpirrolidona (PVP) (FertiPro, Bernem, Bélgica) sobre la cual se añade una gota de 10 μ L de la muestra de semen capacitada con los espermatozoides para su selección en base a su motilidad y morfología. En el caso de que la muestra de espermatozoides no presentase motilidad, se añadió pentoxifilina (5 μ L) a la gota de medio (ORIGIO Handling; CooperSurgical, Ballerup, Dinamarca) para obtener motilidad en los espermatozoides vivos y poder seleccionarlos para su microinyección.

Inmediatamente después de la inseminación, los ovocitos inyectados se dispusieron en placas de cultivo de incubador tipo time-lapse (GERI (TM); Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en medio de cultivo Gems (Geri Medium; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) bajo aceite mineral en una atmósfera altamente controlada (37°C, 6% de CO₂ y 5% de O₂).

Desarrollo y evaluación de los embriones

Los embriones siempre se incubaron en un ambiente altamente controlado a 37°C, 6,0% de CO₂ y 5,0% de O₂, siendo continuamente monitorizados gracias a la tecnología time-lapse. A las 17-19 horas post-fecundación se observaron los ovocitos para comprobar si fueron correctamente fecundados con la visualización de los dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino y los dos pronúcleos en el citoplasma. Los cigotos se mantuvieron en cultivo embrionario hasta día 3 (72 horas post-ICSI) para su evaluación morfofocinética, momento en el cual también se renovó el medio de cultivo (Gems; Geri Medium, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se realizó un agujero en la zona pelúcida del embrión (Hatching asistido o eclosión asistida) para facilitar la salida del embrión para la realización de la biopsia de TE. Los embriones en cultivo se mantuvieron hasta día 5 o

día 6 de desarrollo embrionario, correspondiente al estadio de blastocisto, los cuales fueron nuevamente evaluados.

La evaluación de la calidad embrionaria se realizó siguiendo los criterios establecidos por ASEBIR. Mediante estos criterios, los embriones quedan clasificados en 4 categorías (A, B, C o D) según el potencial implantatorio esperado, siendo de mayor a menor probabilidad respectivamente (Asebiri, 2015). En día 3 de desarrollo, se evaluaron los siguientes parámetros morfológicos: número de células, simetría celular, tipo y porcentaje de fragmentación, presencia o ausencia de multinucleación y el grado de compactación (Figura suplementaria 1 y 2). En el estadio de blastocisto (día 5 o 6 de desarrollo), se evaluó el tamaño de la cavidad blastocística, y el aspecto e integridad de la masa celular interna (MCI) y el TE (Figura suplementaria 3). En base a la calidad de este último, queda definida la calidad final del embrión. Aquellos embriones de buena calidad, es decir, los clasificados como A-C, fueron sometidos a la biopsia embrionaria para su análisis genético.

Biopsia embrionaria para PGT-A

La biopsia embrionaria consiste en obtener un pequeño número de células del TE (10-15 células) para su posterior procesamiento y análisis. En este caso, el análisis genético consistió en analizar los 23 pares de cromosomas del embrión para comprobar la existencia de anomalías numéricas que denoten euploidía o aneuploidía embrionaria.

Las células obtenidas fueron aquellas que salieron por el agujero de la zona pelúcida hecho previamente en día 3, siempre lo más alejado de la MCI del embrión. La biopsia embrionaria se realizó en un microscopio con láser asociado a un aumento de 400X. El grupo de células del TE obtenido se lavó en un medio especial para biopsia embrionaria proporcionado por la empresa que realizó los análisis genéticos. Para este estudio, los realizó la empresa JUNO Genetics©, que realizó el análisis genético mediante la técnica NGS (Next Generation Sequencing).

Transferencia embrionaria

Tras conocer los resultados genéticos de los embriones analizados se programó la transferencia de aquellos embriones que resultaron ser cromosómicamente normales, es decir, con resultado de euploidía. El ciclo de transferencia se programó de acuerdo con el ginecólogo y la paciente. El ciclo de transferencia embrionaria pudo ser natural (siguiendo el ciclo menstrual de la paciente) o estimulado mediante terapia hormonal sustitutiva

(Estradiol + Progesterona) como preparación endometrial previa siguiendo los protocolos habituales.

Los embriones para transferir se eligieron en base a su calidad sin conocer a qué grupo de estudio (T-ICSI o E-ICSI) pertenecían en todo momento. La transferencia se realizó cuando la paciente tuvo el grosor endometrial adecuado y mediante eco-guiado. A los 14 días post-transferencia, se realizó un análisis de sangre para conocer si existía un embarazo con un resultado de β -hCG >10 UI/L.

FISH de espermatozoides

Se realizó un análisis genético de los espermatozoides, tanto de origen testicular como de eyaculado, de los pacientes participantes del estudio. Para ello, se realizó la técnica FISH sobre cinco cromosomas en concreto, el 13, 18, 21, X e Y, con el objetivo de conocer la normalidad de las muestras en base a la proporción de haploidía, aneuploidía (nulisomía y disomía), y diploidía presente en los espermatozoides.

Una parte de las muestras de espermatozoides descongeladas y capacitadas utilizadas para la inseminación de los ovocitos se guardó en un tubo eppendorf sellado y mantenido frío para su envío y posterior análisis. Este análisis fue realizado por la empresa Sistemas Genómicos (Ascires) (Paterna, Valencia, España), que determinaron la proporción de espermatozoides que presentaron un número de cromosomas anormal mediante un FISH automatizado (García-Mengual et al., 2019). Se analizaron hasta un total de 10.000 espermatozoides/ muestra, contabilizados con un microscopio especializado que permite el estudio simultáneo de hasta 3 cromosomas en el mismo núcleo.

Análisis estadístico

Antes de proceder con el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante contrastes de hipótesis y/o construcción de modelos estadísticos, se realizó un análisis descriptivo (numérico y gráfico) previo, con el objetivo de estudiar el comportamiento y la distribución de las variables que intervienen en el estudio, evaluar la calidad de los datos y detectar anomalías (cantidad de datos faltantes y valores atípicos que pudieran estar presentes).

Para las variables cuantitativas, se utilizaron medidas de localización como el máximo, mínimo y cuartiles, y medidas de dispersión como la media y la desviación típica. Además, se calculó los intervalos de confianza al 95% para el valor de la media, y los

coeficientes de asimetría de Pearson y el coeficiente de curtosis. Para las variables categóricas, se calcularon tablas de frecuencia y proporciones junto a IC al 95%.

Para dar respuesta al objetivo principal, con la intención de valorar si existen diferencias entre los dos grupos, se utilizó la prueba de Chi cuadrado para proporciones de embriones normales transferibles. Para los secundarios, con la intención de valorar si existen diferencias entre ellos, se utilizó la prueba t de Student o Chi cuadrado en medias y proporciones respectivamente. Además, las medidas de éxito reproductivo (gestación clínica, gestación evolutiva, aborto y recién nacido vivo) se calcularon por transferencia embrionaria realizada como por pareja.

Metaanálisis

Búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda sistemática en las plataformas Pubmed, Web of Science (WoS), Medline, y el registro de ensayos clínicos (clinicaltrials.gov) para encontrar estudios y comunicaciones en congresos relacionados hasta noviembre del 2023. Los términos clave utilizados para la búsqueda fueron “sperm DNA fragmentation”, “ejaculated sperm”, “testicular sperm” e “ICSI”.

Criterios de elegibilidad y selección de estudios

Se incluyeron todos los estudios clínicos realizados en humanos que no fueran revisiones sistemáticas o metaanálisis previos. Se incluyeron todos los estudios en los que: i) se comparan ciclos de ICSI realizados con espermatozoides del eyaculado con ciclos de ICSI con espermatozoides de origen testicular; ii) los varones incluidos en el estudio tuvieran un análisis de FAE en el semen eyaculado, y/o en los espermatozoides del testículo; y iii) varones con fallos previos de ICSI con semen eyaculado y/o infertilidad severa (oligozoospermia). Quedaron excluidos de la selección estudios en los que se incluyeran varones con azoospermia, varones sin análisis de los niveles de FAE, y que utilizaran métodos de selección espermática (PICSI, MACS, etc.).

Extracción de datos

Para cada estudio se examinaron los siguientes datos: i) grado de FAE en el semen eyaculado y en los espermatozoides del testículo; ii) técnica utilizada para medir la FAE; iii) población de estudio (historia de fallo previo de ICSI y/u oligozoospermia severa); iv) análisis de los parámetros seminales (varones con normozoospermia, oligozoospermia,

criptozoospermia; v) técnica de extracción quirúrgica de espermatozoides; vi) diseño de estudio (retrospectivo, prospectivo, casos y controles, casos cruzados).

Resultados clínicos evaluados

Se estableció como resultado principal la diferencia en los niveles de FAE entre los espermatozoides del eyaculado y los testiculares. Otros resultados evaluados (secundarios) fueron la tasa de fecundación, la tasa de embarazo clínico, la tasa de aborto y la tasa de recién nacido vivo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Review Manager 5.4.1 software (Cochrane Collaboration). Se consideró significativo un p valor <0,05.

Para las variables dicotómicas se calcularon la OR y el IC del 95%, mientras que para las variables continuas se utilizó la diferencia de medias estandarizada (DM) y el IC del 95%. Se utilizó la prueba I^2 para cuantificar la heterogeneidad entre los diferentes ensayos. Se obtuvieron los gráficos tipo *Funel* (embudo) para representar la heterogeneidad de los ensayos incluidos y gráficos estilo árbol o *forest plot* para exponer todos los artículos incluidos para cada resultado reproductivo. Se aplicó la prueba de efectos aleatorios con la intención de controlar la heterogeneidad de los resultados obtenidos.

RESULTADOS

Análisis retrospectivo

La etiología de la infertilidad femenina fue edad materna avanzada (21,4%), anexectomía (14,3%), síndrome poliquístico ovárico (14,3%), baja respuesta (7,1%) y factores uterinos (7,1%). Las demás (35,7%) se diagnosticaron como idiopáticas o sin factor femenino de infertilidad. El diagnóstico de infertilidad masculina fue oligozoospermia grave (4,8%), oligoastenoteratozoospermia (23,8%), astenozoospermia (23,8%), criptozoospermia (23,8%) y oligoastenozoospermia (23,8%).

Tabla 4. Características demográficas y de la estimulación ovárica de la población en función del grupo de estudio E-ICSI o T-ICSI.

Variables	E-ICSI (n=27)	T-ICSI (n=27)	P-valor
Edad mujer (años)	36,2 (34,4-37,9)	37,0 (35,5-38,5)	0,3
IMC mujer (kg/m ²)	24,0 (22,6-25,4)	23,8 (22,5-25,2)	0,9
Edad varón (años)	40,2 (37,9-42,4)	41,2 (39,1-43,3)	0,4
IMC varón (kg/m ²)	27,0 (25,1-29,0)	27 (25,1-29,0)	0,7
Recuento de folículos antrales (RFA)	13,2 (10,5-16,0)	11,7 (5,7-17,8)	0,6
Niveles HAM	2,5 (5,4-8,8)	2,5 (1,0-4,1)	1
N.º días de estimulación	11,8 (9,6-14,1)	11 (10,4-11,7)	0,3
Dosis de FSH total (UI)	1.951,1 (1.673,2-2.229,0)	1.821,3 (1.560,8-2.081,8)	0,3
Dosis de LH total (UI)	-	925 (203,2-1646,8)	0,9
Dosis de HMG total (UI)	1.051,3 (812,5-1.290,0)	998,2 (715,7-1.280,7)	0,5
Niveles E2 en el día de hCG (pg/ml)	2.195,4 (1.736,4-2.654,3)	2.150,7 (1.732,7-2.568,6)	0,8
Niveles de P4 en el día de hCG (pg/ml)	1,0 (0,8-1,1)	1,0 (0,8-1,2)	1
N.º días preparación endometrial	17,6 (14,7-20,6)	17,0 (16,0-18,0)	0,5
Último grosor endometrial (mm)	9,8 (9,2-10,5)	9,3 (8,4-10,2)	0,2
Último nivel de E2 (pg/ml)	2.174,5 (1.641,1-2.707,9)	2.107,9 (1.423,2-1.550,1)	0,8
Último nivel de P4 (pg/ml)	1,0 (0,8-1,2)	1,0 (0,7-1,2)	0,5
N.º de ovocitos aspirados	12,3 (10,0-14,5)	12,6 (9,8-15,3)	0,9
N.º ovocitos MII	11,6 (9,3-14,0)	11,0 (8,4-13,6)	0,7
N.º ovocitos MI	0,7 (0,3-1,0)	0,7 (0,4-1,1)	1
Estado del ovocito (%)	-	-	0,5
Fresco	77,8 (57,7-91,4)	66,7 (46,0-83,5)	-
Vitrificado	7,4 (0,9-24,3)	28,5 (6,3-38,1)	-
Mixto	14,8 (4,2-33,7)	14,8 (4,2-33,7)	-
N.º ovocitos inseminados	10,9 (8,8-13,1)	10,9 (8,3-13,4)	0,9
N.º de ovocitos correctamente fecundados	7,1 (5,4-8,8)	6,9 (5,1-8,6)	0,9
N.º embriones obtenidos	6,6 (5,0-8,3)	7,4 (5,9-8,9)	0,6
N.º embriones biopsiados	3,7 (2,8-4,6)	4,0 (3,2-4,8)	0,3
N.º embriones analizados	3,7 (2,8-4,6)	4,0 (3,2-4,8)	0,3
N.º embriones informativos	3,6 (2,8-4,5)	4,0 (3,2-4,8)	0,2
N.º embriones aneuploides	2,7 (2,0-3,5)	3,0 (2,4-3,7)	0,2

Los valores son medias o proporciones junto con su intervalo de confianza (IC 95%). Los valores p se calcularon con la prueba t-student para las medias y la prueba Chi-cuadrado para las proporciones. IMC: índice de masa corporal; HAM: hormona antimülleriana; FSH: hormona foliculoestimulante; LH: hormona luteínica; E2: estradiol; P4: progesterona; hCG: gonadotropina coriónica humana.

Las características demográficas y relacionadas con el ciclo de estimulación están recogidas en la Tabla 4. El tiempo medio transcurrido entre ambos tratamientos fue de 509 días (41-1.471) (17 meses). No se encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de ciclos. Las características del semen de los ciclos de E-ICSI figuran en la Tabla 5.

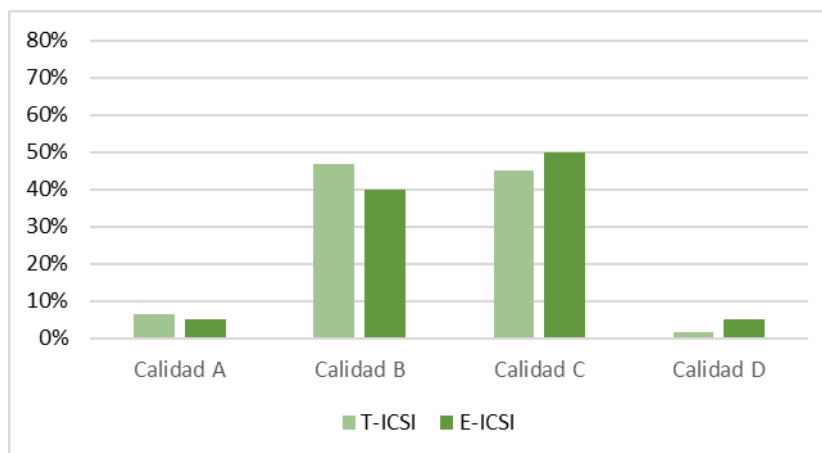
Tabla 5. Parámetros seminales de las muestras eyaculadas en fresco y tras la capacitación de los ciclos E-ICSI (n=27).

Parámetros seminales	Media	IC 95%
Muestra fresca		
Volumen (ml)	2,5	1,8-3,2
Concentración (millones/ml)	10,0	2,0-18,0
Motilidad progresiva (%)	4,4	0,1-8,6
Motilidad no progresiva (%)	11,4	-3,3-26
Inmóviles (%)	87,1	70,6-99,6
Recuento total de espermatozoides (millones)	6,6	-1,1-14,4
Muestra capacitada		
Volumen (ml)	0,4	0,1-0,6
Concentración (millones/ml)	0,9	0,4-1,5
Motilidad progresiva (%)	12,3	1,2-23,3
Motilidad no progresiva (%)	15,3	-1,5-32,1
Inmóviles (%)	73,8	54,5-93,0
Recuento total de espermatozoides (millones)	0,1	0,0-0,3

IC: intervalo de confianza

El número total de embriones evaluados fue de 375, de los cuales 214 (57%) fueron biopsiados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de fecundación ni en los parámetros de calidad embrionaria en día 5 de desarrollo entre los embriones de los E-ICSI y los del grupo T-ICSI. La calidad embrionaria se establece según las características cualitativas del TE; por lo cual, se halló un mayor número de embriones de mejor calidad en el grupo T-ICSI que en los ciclos de E-ICSI, aunque de manera no significativa ($p=0,7$): TE calidad A (6,5% vs 5,0%); calidad B (46,8% vs 40,0%), calidad C (45,2% vs 50,0%) y calidad D (1,8% vs 5,0%) (Figura 3).

Figura 3. Representación de la proporción de embriones según su calidad para cada grupo de estudio: T-ICSI y E-ICSI.



Los resultados de ambos ciclos se muestran en la Tabla 6. Se observó una proporción significativamente mayor de blastocistos de buena calidad por ovocito 2PN en los ciclos T-ICSI: 33,6% (30,4-36,9) vs 24,2% (20,3-28,0) en el ciclo previo E-ICSI ($p < 0,001$). La tasa de aneuploidía fue comparable en ambos ciclos, aunque los embriones procedentes de los ciclos de ICSI con semen eyaculado fue más baja pero no estadísticamente significativa.

Tabla 6. Resultados clínicos de los ciclos de ICSI con espermatozoides eyaculados (E-ICSI) versus ICSI con espermatozoides testiculares (T-ICSI).

	E-ICSI (n=27)	T-ICSI (n=27)	P-valor
Tasa de fecundación (%)	65,8 (56,4-75,3)	66,7 (59,2-74,2)	0,7 [†]
Tasa de llegada a blastocisto (%)			
Por ovocito inseminado	50,7 (40,4-61,0)	50,6 (43,8-57,4)	1,0 *
Por ovocito correctamente fecundado	66,5 (56,5-76,5)	66,4 (56,9-71,9)	0,7*
Tasa de blastocisto de buena calidad (%)			
Por ovocito inseminado	18,6 (7,3-29,9)	19,8 (11,1-28,5)	0,9 *
Por ovocito correctamente fecundado	24,2 (20,3-28,0)	33,6 (30,4-36,9)	<0,001 *
Por número total de blastocistos	35,0 (20,4-49,6)	45,8 (34,0-57,5)	0,2 *
Tasa de aneuploidía (%)			
Por ovocito inseminado	26,8 (18,1-35,5)	30,7 (23,4-38,0)	0,3 [†]
Por ovocito correctamente fecundado	41,7 (28,2-55,2)	46,6 (37,0-56,2)	0,4 [†]
Por número total de blastocistos	72,1 (59,1-85,2)	76,2 (66,2-86,2)	0,6 [†]
N.º total de embriones transferidos	22/177 (7,6-17,3)	18/197 (5,1-13,2)	-
Día de la transferencia embrionaria (%)			
D5 fresco	40,9 (20,7-63,7)	33,3 (13,3-59,0)	-
D5 congelado	40,9 (20,7-63,7)	55,6 (30,8-78,5)	-
D6 fresco	18,2 (5,2-40,3)	11,1 (1,4-34,7)	-

Los valores son medias o proporciones junto con su intervalo de confianza (IC 95%). Los p-valores se calcularon con la prueba t-student* o con la prueba t-student pareada[†]. IC: intervalo de confianza; D5: día 5; D6: día 6.

Todas las transferencias fueron de un único embrión, transfiriéndose un total de 40 blastocistos euploides, tanto en día 5 como en día 6 de desarrollo embrionario. Del total de las 27 parejas incluidas, 16 tuvieron una transferencia embrionaria con implantación, de las cuales 11 fueron embarazos bioquímicos (68,8% (41,3-89,0)), 10 confirmaron el embarazo clínico (62,5% (35,4-84,8)) y un 50% (24,7-75,3) (8 mujeres) confirmaron un embarazo evolutivo; todas ellas obtuvieron un recién nacido (50% (24,7-75,4)). Tres pacientes abortaron en total (27,3% (6,0-61,0)).

Estudio prospectivo

Análisis descriptivo de la población de estudio

Se reclutaron un total de 13 parejas, de las cuales 6 cumplieron finalmente los criterios de inclusión y completaron el estudio. De las parejas incluidas, 4 varones tenían diagnóstico de oligozoospermia severa, mientras que los otros dos pacientes presentaron normozoospermia pero fallos de ICSI previos. Se obtuvo un total de 119 ovocitos, siendo 87 maduros (estadio MII) y que se asignaron aleatoriamente a uno de los dos grupos de estudio: 42 ovocitos se inseminaron con espermatozoides de la muestra eyaculada descongelada (E-ICSI) y 45 ovocitos con los espermatozoides procedentes de testículo descongelados (T-ICSI).

Tabla 7. Análisis descriptivo de la población de estudio (n=6).

Variable	Media o proporción (DS)	IC 95%
Edad mujer	31,8 (2,9)	28,8-34,9
IMC mujer (kg/m ²)	22,8 (2,5)	18,7-26,8
Edad varón	37,7 (7,3)	30,0-45,4
FAE (%)	44,8 (16,6)	27,5-62,2
Días estimulación	9,8 (1,3)	8,4-11,2
Dosis FSH total (UI)	1.605,7 (595,5)	980,7-2.230,6
Dosis HMG total (UI)	608,3 (146,3)	454,8-761,9
Nivel E2 inducción (UI)	2.008,3 (473,8)	1.511,1-2.505,5
Nivel P4 inducción (UI)	0,8 (0,5)	0,2-1,4
N.º ovocitos aspirados	19,8 (7,8)	11,6-28,1
N.º ovocitos maduros (MII)	14,5 (5,8)	8,4-20,6
N.º ovocitos inseminados	14,5 (5,8)	8,4-20,6
N.º ovocitos correctamente fecundados (2PN)	8,3 (4,0)	4,1-12,6
N.º de embriones obtenidos	3,5	0,2-6,8
N.º de embriones biopsiados	3,5	0,2-6,8
N.º de embriones euploides	2,7	-0,4-4,7

DS: desviación estándar, IC: intervalo de confianza, IMC: índice de masa corporal, FAE: fragmentación ADN espermático, FSH: hormona folículo estimulante, HMG: gonadotropina menopáusica humana, E2: estradiol, P4: progesterona; MII: metafase II; 2PN: ovocito con 2 pronúcleos o cigoto.

En la Tabla 7 se muestran las características basales de la población de estudio y las variables asociadas a la estimulación ovárica controlada. El número medio de ovocitos obtenidos en la punción fue 19,8 (11,6-28,1), siendo 14,5 (8,4-20,6) el número medio de ovocitos en estadio MII que estaban disponibles para su microinyección. El número medio de ovocitos 2PN o cigotos por paciente fue de 8,33 (4,1-12,6).

En la Tabla 8 se exponen los parámetros seminales correspondientes a las muestras de semen eyaculado y las procedentes del testículo en fresco. La FAE media de la primera muestra seminal del eyaculado de los varones del estudio fue de 44,8% (27,5-45,4). En cambio, el análisis de las muestras obtenidas el día de la biopsia testicular y posteriormente utilizadas en la ICSI, demostró que la FAE de los espermatozoides del testículo fue un 13% inferior que la FAE de los espermatozoides de la muestra del eyaculado obtenida en el mismo día, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,18$): 44,7% (31,3-58,3) vs 58,5% (37,6-79,4), respectivamente.

Tabla 8. Parámetros seminales correspondientes a las muestras de espermatozoides del eyaculado y procedentes del testículo utilizadas para la ICSI.

Variable	Media o proporción (DS)	IC 95%
Muestra eyaculada		
Volumen (ml)	1,5 (2,2)	-0,79-3,83
Concentración (millones/ml)	5,5 (12,02)	-7,08-18,15
Total espermatozoides (millones)	4,4 (9,62)	-5,71-14,5
Móviles progresivos (%)	2,67 (2,42)	0,12-5,21
Móviles no progresivos (%)	1,33 (1,51)	-0,25-2,91
Inmóviles (%)	96 (3,85)	91,96-100,04
Móviles progresivos totales (millones)	0,25 (0,58)	-0,37-0,86
Muestra testicular		
Volumen (ml)	0,63 (0,22)	0,41-0,86
Concentración (millones/ml)	0,09 (0,2)	-0,12-0,3
Total espermatozoides (millones)	0,05 (0,1)	-0,06-5,71
Móviles progresivos (%)	0,83 (0,75)	0,04-1,62
Móviles no progresivos (%)	0,5 (1,51)	-0,07-1,07
Inmóviles (%)	98,67 (1,21)	97,4-99,94
Móviles progresivos totales (millones)	0	0

DS: desviación estándar, IC: intervalo de confianza

Parámetros de calidad embrionaria

La tasa media de fecundación de la población fue de 42,5% (25,9-59,0). No hubo diferencias significativas en la tasa de fecundación entre el grupo T-ICSI y el grupo E-ICSI (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de laboratorio de los ciclos de ICSI con espermatozoides testiculares (T-ICSI) o con espermatozoides del eyaculado (E-ICSI).

Parámetro	T-ICSI (95% IC)	E-ICSI (95% IC)	P-valor
Tasa fecundación (%)	53,3 (24/45) (38,1-68,1)	61,9 (26/42) (61,9-76,0)	0,55
Tasa llegada a blastocisto /ovocitos inseminados (%)	22,2 (10/45) (11,7-37,5)	26,2 (11/42) (14,4-42,3)	0,86
Tasa llegada a blastocisto /ovocitos 2PN (%)	41,7 (10/24) (22,8-63,1)	42,3 (11/26) (24,0-62,8)	1
Tasa de blastocisto de buena calidad (A+B) / ovocitos inseminados (%)	15,6 (7/45) (7,0-30,1)	11,9 (5/42) (4,5-26,4)	0,86
Tasa de blastocisto de buena calidad (A+B) / ovocitos 2PN (%)	29,2 (7/24) (13,4-51,6)	19,2 (5/26) (7,3-40,0)	0,62
Tasa de blastocisto de buena calidad (A+B) / total de blastocistos (%)	70 (7/10) (35,4-91,9)	45,5 (5/11) (18,1-75,4)	0,45

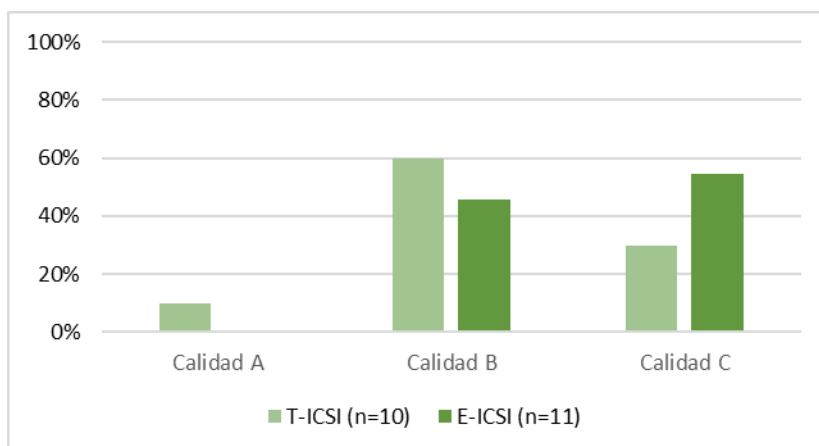
IC: intervalo de confianza; 2PN: ovocito con 2 pronúcleos o cigoto.

El número total de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto y fueron evaluados fue 21. No hubo diferencias en las características cualitativas en los embriones en día 3 de desarrollo, siendo para los grupos T-ICSI y E-ICSI, respectivamente: número de células: 7,05 (5,9-8,2) vs 7,0 (5,9-8,5) ($p=0,85$); porcentaje de fragmentación: 14,8 (10,2-19,3) vs 8,3 (4,2-12,3) ($p=0,03$); grado de simetría: 1,8 (1,6-2,0) vs 2,2 (1,9-2,4) ($p=0,04$); y grado de compactación, 0,4 (0,2-0,6) vs 0,3 (0,1-0,5) ($p=0,52$).

La tasa de llegada a blasto según el número de ovocitos inseminados y según el número de ovocitos 2PN fue comparable entre el grupo T-ICSI y E-ICSI (Tabla 9). Sin embargo, el número de embriones de buena calidad (considerados como aquellos de calidad A+B) fue superior en el grupo T-ICSI en todos los cálculos realizados, llegando a tener un 10% más de blastocistos A+B que en los embriones procedentes de ovocitos E-ICSI. En la Figura 4 se representa la proporción de embriones según la calidad de estos para cada grupo.

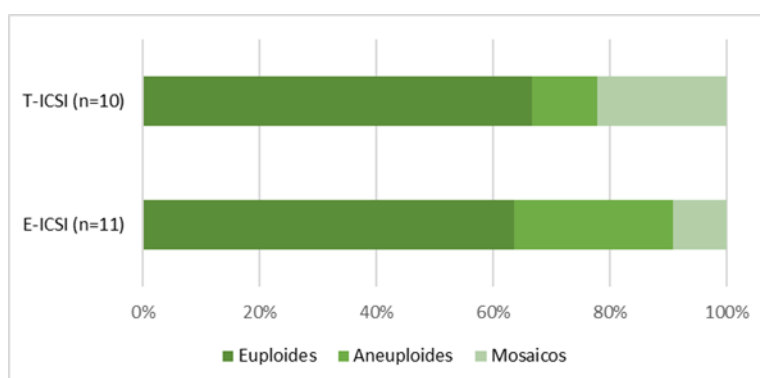
En relación con la tasa de euploidía, un total de 21 blastocistos fueron biopsiados, siendo 13 los embriones euploides (61,9% (38,7-81,1) disponibles para transferir. La tasa media de euploidia por paciente fue 52,78% (5,3-100,3).

Figura 4. Representación de la proporción de embriones según su calidad para cada grupo de estudio: T-ICSI (n=10) y E-ICSI (n=11).



Para cada grupo de estudio, los embriones del grupo T-ICSI presentaron una tasa de euploidía similar a los del grupo E-ICSI: 60,0% (27,4-86,3) vs 63,6% (31,6-87,6) ($p=1,0$). En cambio, hubo una mayor proporción de embriones aneuploides en el grupo E-ICSI (27,3% (0,5-42,9) que en T-ICSI (10% (0,52-45,9)), aunque no fue estadísticamente significativa ($p=0,65$). Hubo una mayor cantidad de embriones con mosaicismo en el grupo de espermatozoides testiculares que en el grupo del eyaculado, 20% (3,5-55,8) vs 9,1% (0,5-42,9) ($p=0,93$), respectivamente (Figura 5).

Figura 5. Representación de la proporción de embriones euploides, aneuploides y mosaico cada grupo de estudio: T-ICSI (n=10) y E-ICSI (n=11).



Análisis de aneuploidía espermática mediante FISH

Se realizó un análisis FISH para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, en los espermatozoides procedentes del eyaculado y del testículo de las muestras utilizadas para la ICSI (Tabla 10). En las muestras de espermatozoides procedentes del eyaculado, la

proporción de un resultado normal:alterado fue de 1:5, es decir, solo uno de los seis varones tuvo un resultado de FISH normal. En los demás, se encontró un desajuste en la proporción correcta en los cinco cromosomas evaluados, siendo más frecuentes las nulisomías para los cromosomas 13, 21, X e Y. En todos ellos, la proporción de los cromosomas sexuales en espermatozoides haploides estaba en la norma 1:1.

En las muestras de espermatozoides testiculares, solo dos análisis resultaron ser informativos, teniendo ambos un diagnóstico alterado. Las otras 4 muestras debido al bajo recuento de células no pudieron realizarse de manera adecuada (resultado incompleto). En este caso, se encontró un desajuste en la proporción de los cinco cromosomas evaluados, siendo todas las alteraciones encontradas nulisomías.

Tabla 10. Relación de los resultados del FISH de las muestras de espermatozoides del eyaculado y del testículo para cada varón incluido en el estudio.

	FISH eyaculado	FISH testículo
Varón 1	alterado	incompleto
Varón 2	normal	alterado
Varón 3	alterado	incompleto
Varón 4	alterado	incompleto
Varón 5	alterado	alterado
Varón 6	alterado	incompleto

Resultados clínicos

Cuatro de seis parejas tuvieron embriones euploides disponibles para transferir, mientras que dos no debido a que una de ellas no tuvo embriones biopsiables y la otra todos los embriones fueron aneuploides tras el PGT. Las transferencias embrionarias siempre se realizaron en base a criterios morfológicos, escogiendo aquellos de mejor calidad sin conocimiento del grupo de estudio al que pertenecía el embrión.

Se transfirieron un total 7 blastocistos euploides en 6 transferencias (5 transferencias de un único embrión (SET) y una transferencia de dos embriones (DET)), realizadas tanto en D5 como en D6 de desarrollo embrionario. Del total, cuatro transferencias embrionarias dieron lugar a una gestación bioquímica (66,7% (24,1-94,0)), de las cuales tres continuaron con el embarazo (tasa de gestación evolutiva 50% (18,8-81,2)); finalmente, dos pacientes tuvieron un parto con un recién nacido vivo (33,3% (6,0-75,9) en el momento del análisis de datos. Ninguna paciente tuvo pérdida gestacional. Los

resultados clínicos en base al número de transferencias realizadas por cada grupo de estudio se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados clínicos calculados por transferencia embrionaria según grupo de estudio al que pertenece el embrión (T-ICSI o E-ICSI). Se realizó un total de 3 transferencias embrionarias por cada grupo.

Parámetro	T-ICSI (95% IC)	E-ICSI (95% IC)	P-valor
Tasa gestación bioquímica	100 (3/3) (31,0-100)	33,3 (1/3) (1,8-87,5)	0,39
Tasa gestación evolutiva	66,7 (2/3) (12,5-98,2)	33,3 (1/3) (1,8-87,5)	1,0
Tasa recién nacido vivo	33,3 (1/3) (1,8-87,5)	33,3 (1/3) (1,8-87,5)	1

IC: intervalo de confianza

Metaanálisis

Descripción de los estudios incluidos

La búsqueda sistemática de artículos y publicaciones resultó en 133 resultados. Tras la revisión de cada uno de ellos, 99 fueron artículos científicos y comunicaciones en congresos, de todos ellos, 12 cumplieron los criterios de inclusión establecidos para poder incluirlos en el metaanálisis; los demás fueron descartados por tener un diseño tipo revisión sistemática y metaanálisis, artículo tipo revisión, no cumplir los criterios de inclusión y exclusión, o la imposibilidad de extraer los datos.

De total de estudios incluidos, 5 son de diseño retrospectivo, 3 de diseño prospectivo, 2 de tipo casos cruzados, un ensayo controlado aleatorizado, y un estudio de serie de casos.

Fragmentación del ADN espermático

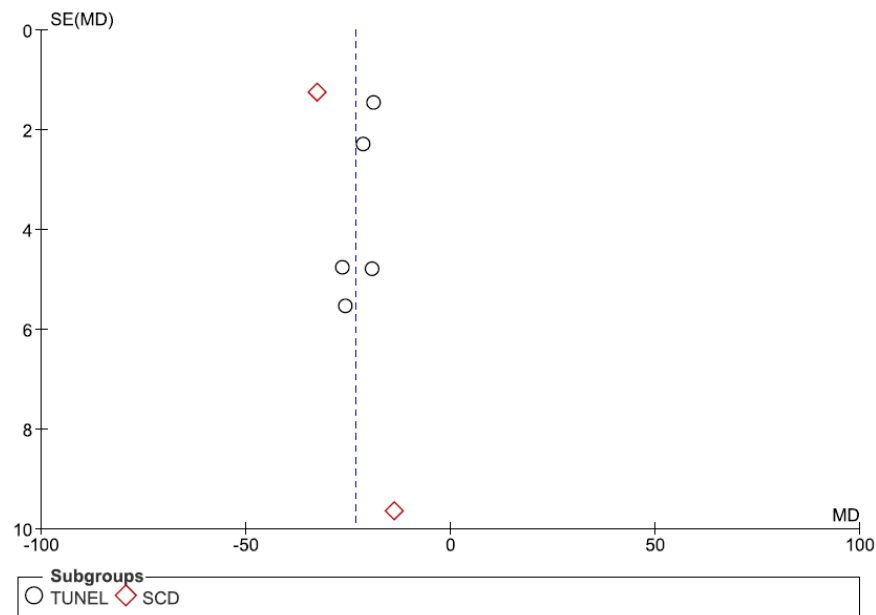
Seis estudios más el nuestro previo compararon los niveles de FAE entre los espermatozoides del testículo y los del eyaculado, en los cuales un total de 457 varones fueron evaluados (S. C. Esteves et al., 2015; Greco, Scarselli, et al., 2005; Herrero et al., 2019; Mehta et al., 2015; Moskovtsev et al., 2010, 2012; Xie et al., 2020).

La media global de FAE en los casos incluidos fue 14,63% $\pm$ 12,80 en T-ICSI y 37,14% $\pm$ 5,80 en E-ICSI ($p=0,000069$). El gráfico Funnel Plot (Figura 6) muestra los estudios incluidos y su distribución en el área según su valor y peso. Se observa una distribución no homogénea relacionada con el sesgo de publicación.

El resultado del metaanálisis indica que la tasa de fragmentación del ADN es significativamente menor en los espermatozoides del testículo que en los del eyaculado, con una DM de -23,32 [-29,60-(-17,30)], con un $I^2= 90\%$ ($p=0,00001$) (Figura 7). Dada

la elevada heterogeneidad del análisis, se aplicó la prueba de Modelo de Efectos Aleatorios (MEA), y se realizó un subanálisis en base a la técnica utilizada para medir la FAE.

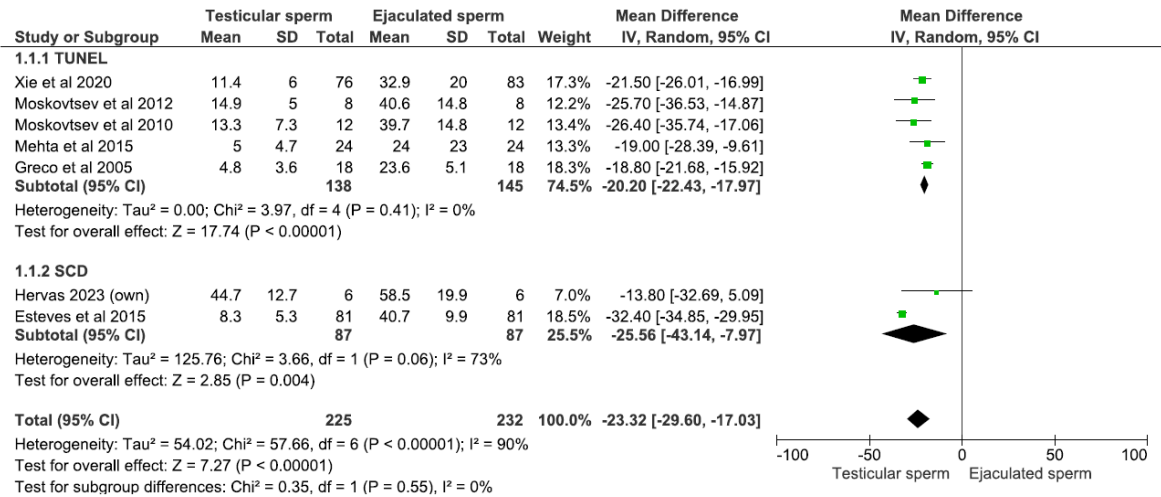
Figura 6. Funnel plot para escrutar la existencia de sesgo de publicación para el análisis del grado de FAE entre los espermatozoides testiculares y espermatozoides del eyaculado.



SCD: Sperm chromatin dispersion test; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labelling assay.

Cinco estudios utilizaron el ensayo TUNEL para evaluar la FAE en sus pacientes (n=283). El efecto fue una DM= -20,20 [-22,43-(-17,97)], con un $I^2=0\%$ ($p<0,00001$), lo que indica una FAE significativamente menor en los espermatozoides del testículo. Un resultado similar obtuvimos cuando se analizaron los 2 estudios que utilizaron la prueba SCD (en un total de 174 varones), la MD fue -25.56 [-43,14-(-7,97)], con un I^2 menor (73%) ($p=0,004$). No hubo ningún estudio que utilizó la técnica SCSA que pudiera ser incluido siguiendo nuestros criterios de inclusión.

Figura 7. Gráfico en árbol o *forest plot* que representa la diferencia media (DM) para las tasas de FAE en los espermatozoides procedentes del testículo y los del eyaculado en varones con elevada FAE en el eyaculado que se realizaron un ciclo de ICSI. Se incluye un subanálisis en función de la técnica utiliza para medir la FAE.



ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides; FAE: fragmentación ADN espermático; IC: interval de confianza; IV: varianza inversa; SCD: Sperm chromatin dispersion test; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labelling assay.

Resultados clínicos

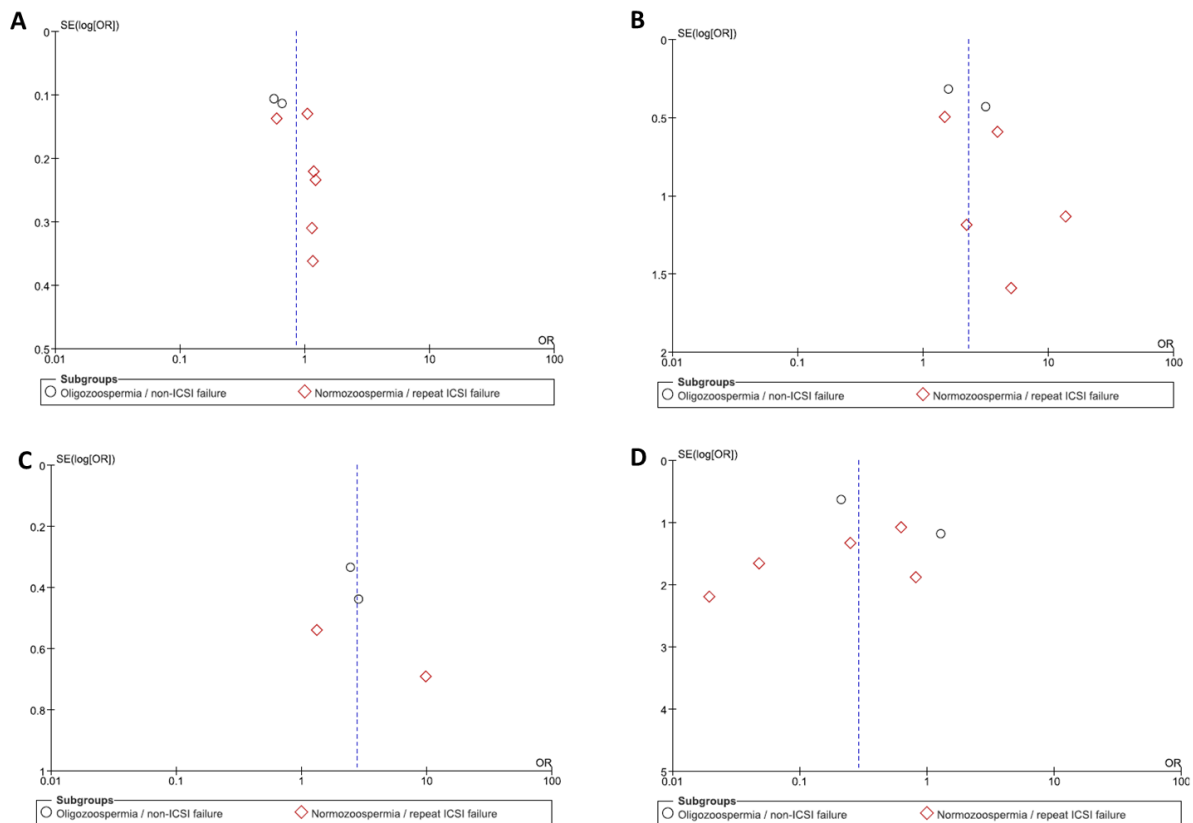
Se evaluó el efecto del cambio del origen del espermatozoide en la tasa de fecundación, tasa de embarazo clínico, tasa de recién nacido vivo y en la tasa de aborto.

Respecto a la tasa de fecundación, se incluyó un total de 7 estudios (Alharbi et al., 2019; Arafa et al., 2018; Bradley et al., 2016; S. C. Esteves et al., 2015; Greco, Scarselli, et al., 2005; Herrero et al., 2019; Pabuccu et al., 2017), en los que se evaluó un total de 6.157 ovocitos inseminados tanto con espermatozoides testiculares (n=3.424) como con espermatozoides del eyaculado (n=2.733) (Figura 8A). La tasa de fecundación media fue 58,18% (56,35-59,65) y 64,87% (63,21-66,79) para cada grupo, respectivamente (p<0,001). El cálculo de la tasa de fecundación conjunta mostró un OR similar entre ambos grupos (OR=0,85 [0,67-1,09], con un índice I²=77%), siendo esta diferencia no significativa (p=0,20).

Con la intención de disminuir la heterogeneidad en el análisis, se aplicó el MEA teniendo en cuenta la calidad del semen del varón y la historia previa de ciclos de ICSI fallidos, estableciendo dos subgrupos de análisis. En dos de los estudios, la población masculina presentaba oligozoospermia y no tenían fallos previos de ICSI. En este caso, la tasa de

fecundación está favorecida por los espermatozoides del eyaculado, OR=0,61 [0,52-0,71], con un $I^2=0\%$ ($p<0,00001$). En cambio, cuando la población seleccionada presenta normozoospermia y al menos un fallo previo de ICSI, no existen prácticamente diferencias en la tasa de fecundación entre ambos tipos de espermatozoides, OR= 0,99 [0,74-1,33], con un $I^2=67\%$ ($p=0,96$) (Figura 9A).

Figura 8. Funnel plot de los estudios incluidos para el cálculo de la tasa de fecundación (A), tasa de gestación clínica (B), tasa de recién nacido vivo (C) y tasa de aborto (D).



Para la tasa de gestación clínica, se incluyeron 6 estudios (Alharbi et al., 2019; Arafa et al., 2018; Bradley et al., 2016; S. C. Esteves et al., 2015; Greco, Scarselli, et al., 2005; Herrero et al., 2019) (Figura 8B) con 501 transferencias embrionarias en total de varones con elevada FAE en el eyaculado, siendo 269 transferencias correspondientes al grupo T-ICSI y 232 transferencias del grupo E-ICSI. La tasa de gestación clínica fue superior en los ciclos con espermatozoides testiculares que en aquellos con espermatozoides eyaculados, 45,35% (39,05-50,95) vs 28,02% (22,24-33,80) ($p<0,001$), con una OR total de 2,29 [1,52-3,45], $I^2=3\%$ ($p<0,0001$). Tras la aplicación del MEA, el efecto del cambio del origen del espermatozoide es superior en las probabilidades de embarazo en el grupo

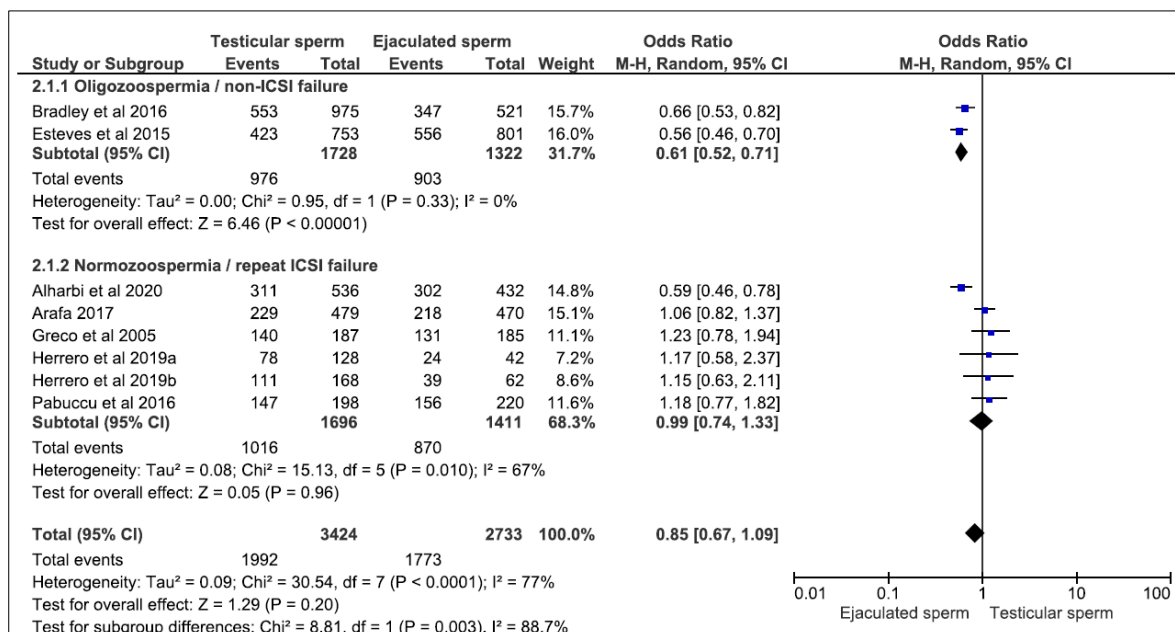
de varones con normozoospermia y fallos previos de ICSI (OR=2,74 [1,40-5,36], $I^2=2\%$; $p<0,003$), que en el grupo con oligozoospermia y sin fallos previos de ICSI (OR=2,13[1,10-4,11], $I^2=39\%$; $p=0,02$ (Figura 9B).

Respecto a la tasa de recién nacido vivo, solo 4 estudios (Alharbi et al., 2019; Arafa et al., 2018; Bradley et al., 2016; S. C. Esteves et al., 2015) reportaron dicho resultado tras 407 transferencias embrionarias (Figura 8C), 212 del grupo T-ICSI y 195 del grupo E-ICSI. En este caso, la tasa de recién nacido vivo media fue significativamente superior para el grupo T-ICSI (45,28% (38,50-52,0)) que en el grupo que usó espermatozoides del eyaculado (23,08% (17,18-29,02)) ($p<0,001$), con un OR de 2,77 [1,49-5,16], con una heterogeneidad $I^2=44\%$ ($p<0,001$). Cuando tenemos en cuenta el subgrupo poblacional, en los varones con oligozoospermia y sin fallos de ICSI la tasa de recién nacido fue significativamente superior cuando se utilizó espermatozoides de testículo, OR=2,58 [1,53-4,34], $I^2=0\%$ ($p=0,004$). En cambio, aunque se observa un mayor efecto en los varones con normozoospermia y fallos de ICSI (OR=3,46 [0,48-24,69], en este caso la diferencia no fue estadísticamente significativa, mostrando además una alta heterogeneidad ($I^2=81\%$) (Figura 9C).

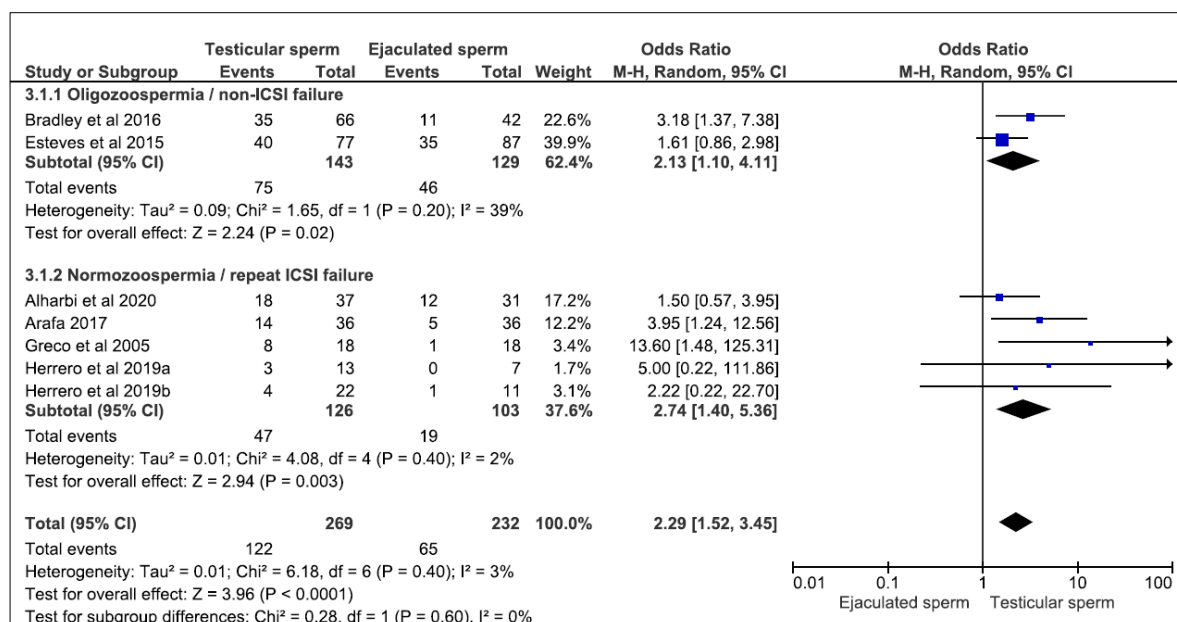
Por último, 7 estudios (Alharbi et al., 2019; Arafa et al., 2018; Bradley et al., 2016; S. C. Esteves et al., 2015; Greco, Scarselli, et al., 2005; Herrero et al., 2019; Pabuccu et al., 2017) informaron sobre la tasa de aborto respecto a las gestaciones en varones con elevada FAE en el eyaculado (Figura 8D). Un total de 32 abortos, 12 del grupo de espermatozoides testiculares y 20 del grupo de espermatozoides procedentes del eyaculado. Los resultados indican una disminución significativa de la probabilidad de aborto en el grupo T-ICSI (8,76% (4,03-13,49) comparado con E-ICSI (27,40% (10,18-16,82)) ($p<0,001$), siendo la OR total igual a 0,29 [0,12-0,67], $I^2=0\%$ ($p=0,004$). Aunque no existe heterogeneidad en el resultado, aplicamos la prueba de efectos aleatorios para evaluar el efecto del cambio del origen del espermatozoide en cada uno de los subgrupos. En el caso de varones con oligozoospermia y sin fallos previos de ICSI, la OR con el uso de espermatozoides testiculares fue OR=0,40 [0,07-2,15], $I^2=45\%$, siendo no significativo ($p=0,29$). En el grupo de varones normozoospermicos con fallos de ICSI, la OR es similar a la global, (OR= 0,25 [0,07-0,91], $I^2= 0\%$ ($p=0,04$), aunque en este caso la heterogeneidad es nula (Figura 9D).

Figura 9. Gráfico en árbol o *forest plot* que representa el odds ratio para la tasa de fecundación (A), tasa de gestación clínica (B), tasa de recién nacido vivo (C) y tasa de aborto (D) de los ciclos de ICSI en los que utilizaron espermatozoides procedentes del testículo o espermatozoides del eyaculado en varones con elevada FAE en el eyaculado con oligozoospermia o con fallos de ICSI previos.

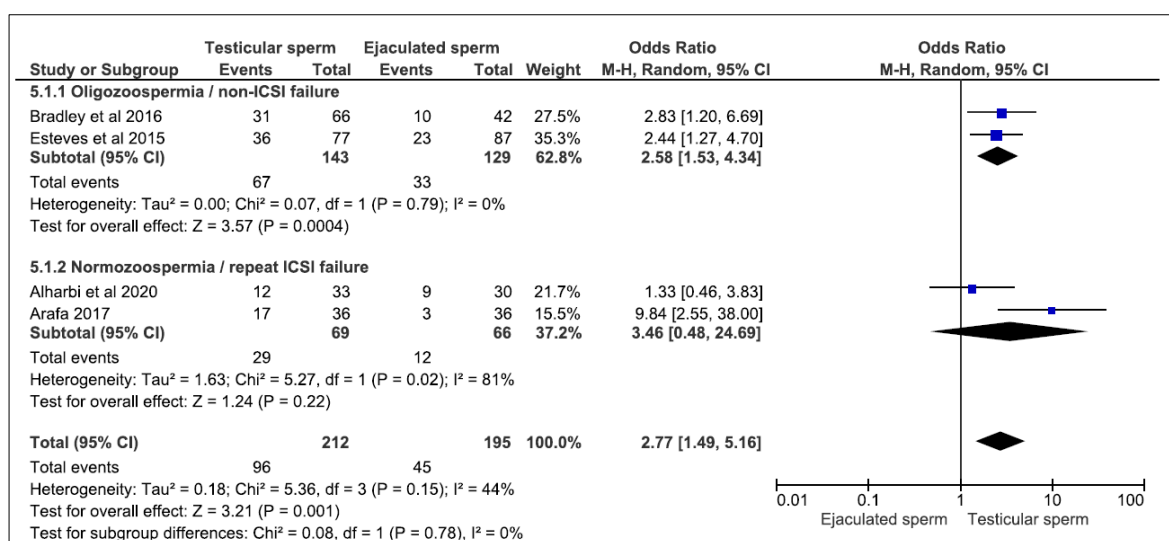
A: Tasa de fecundación



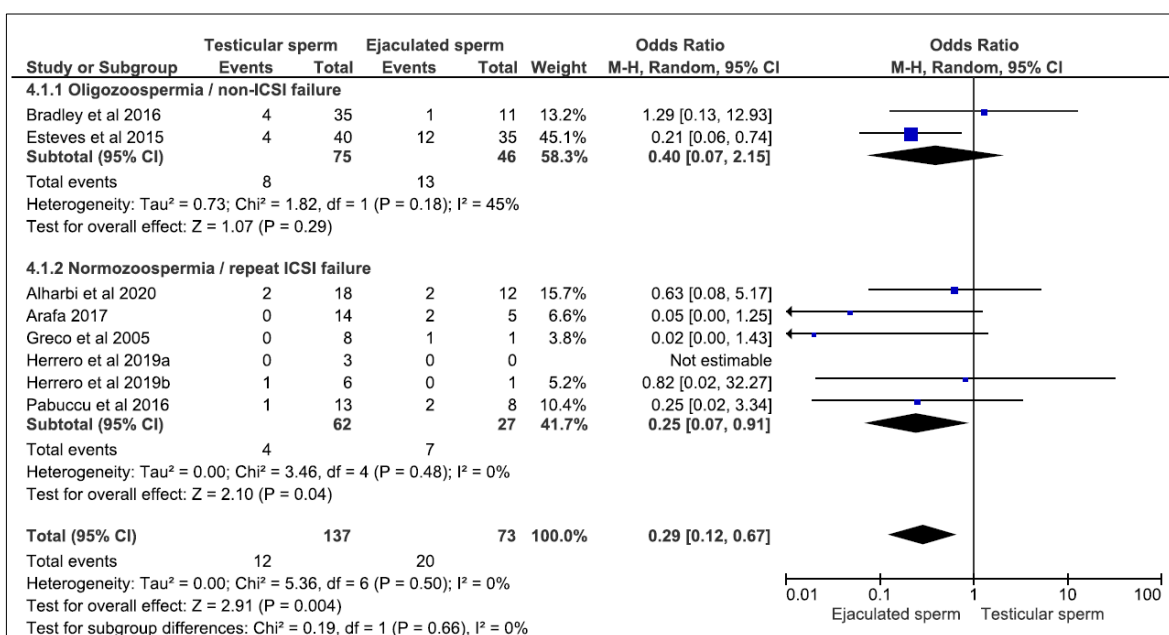
B: Tasa de gestación clínica



C: Tasa de recién nacido vivo



D: Tasa de aborto



ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides; FAE: fragmentación ADN espermático; IC: intervalo de confianza.

DISCUSIÓN

La infertilidad masculina puede constituir en un 30% de las veces el problema de la pareja para concebir de manera natural, y en algunas ocasiones, estos problemas pueden presentarse en conjunto con factores femeninos (Mélodie & Christine, 2018). Hoy en día, la herramienta clínica más comúnmente utilizada para evaluar el estatus de fertilidad del varón es el análisis básico del semen o espermiograma. Este análisis consiste en una valoración tanto cualitativa como cuantitativa de la muestra seminal y su contenido siguiendo las directrices marcadas por la OMS (World Health Organization, 2010). En base a parámetros seminales como la concentración de espermatozoides, su motilidad, y el aspecto morfológico de estos, es posible realizar una primera evaluación de la calidad del semen. Sin embargo, parámetros seminales dentro de los valores de referencia normales no garantiza la fertilidad del varón, al igual que los valores por debajo de la normalidad no implica esterilidad o patología. Con esta prueba no es posible determinar el potencial fértil del varón, ya que cualquiera de los parámetros seminales por si solos o en conjunto no son capaces de predecir la probabilidad de embarazo o de éxito reproductivo (Ombelet et al., 1997; Patel et al., 2018). Además, con el análisis básico del semen no se pueden valorar otras disfunciones intrínsecas del espermatozoide.

Esta problemática ha llevado a numerosos clínicos a desarrollar otras pruebas complementarias al espermiograma que aporten más información sobre la funcionalidad de la célula espermática y el potencial fértil masculino. Entre estas se encuentra la determinación de la fragmentación del ADN paterno, que se ha establecido en los últimos años como un análisis frecuente más en el diagnóstico de la fertilidad del varón (Agarwal, Barbăroșie, et al., 2020; Agarwal & Allamaneni, 2005; S. C. Esteves et al., 2020). El daño en la cromatina paterna puede originarse a nivel testicular o tras la salida del espermatozoide del testículo (daño post-testicular), siendo la causa principal la presencia de estrés oxidativo elevado (Agarwal, Majzoub, et al., 2016). Según el tipo de daño ocasionado, se habla de roturas en una única cadena de ADN (simple) o en ambas (doble), y en función de su amplitud, la secuela que pueda tener sobre la funcionalidad del espermatozoide y del embrión resultante es variada. Además, la FAE se puede presentar tanto en varones con parámetros seminales dentro de la normalidad como en varones con alteraciones seminales importantes (Feijó & Esteves, 2014; Saleh et al., 2002), pudiendo condicionar aún más el éxito reproductivo.

Son muchos los estudios realizados que han tratado de dilucidar el efecto que tiene la FAE sobre los resultados reproductivos pero siempre con conclusiones controvertidas.

Por una parte están aquellos autores que hallan un efecto negativo de la FAE sobre las probabilidades de embarazo en la concepción natural (Zini, 2011) y tras las TRA. Específicamente en estas últimas, que son las que nos atañen, los resultados son muy dispares; algunos encontraron una peor calidad embrionaria (Avendaño et al., 2010; Casanovas et al., 2019; Sedó et al., 2017), que se refleja en unas bajas tasas de implantación y de embarazo (Borges et al., 2019; Ribas-Maynou et al., 2012; Sedó et al., 2017), junto con un aumento en las probabilidades de aborto (Robinson et al., 2012; Simon et al., 2011) tras la FIV e ICSI. En cambio, otros autores no encontraron dicho efecto deletéreo, hallando resultados clínicos similares en las tasas de fecundación, embarazo y aborto (Antonouli et al., 2019; Esbert et al., 2011; Green et al., 2020; Hervás et al., 2022; Hervás et al., 2022; Ten et al., 2021) entre las parejas con una alta y baja FAE. Además, algunos autores señalan que el efecto que pueda tener la FAE sobre los resultados de las TRA depende de la técnica utilizada, de esta manera, han encontrado que el impacto del daño en la cromatina paterna sería más evidente en los ciclos de FIV que en los de ICSI (Z. Li et al., 2006; Oleszczuk et al., 2016; Z. Zhang et al., 2015).

Pese a la discusión actual, uno de los objetivos actuales en clínica es disminuir el efecto que la cromatina paterna dañada pudiera tener en los resultados reproductivos en el caso de pacientes con elevada FAE en los espermatozoides del eyaculado. Se han desarrollado diferentes estrategias clínicas cuya finalidad es disminuir la probabilidad de utilizar un espermatozoide con la cromatina fragmentada, ya sea bien reduciendo la fuente del origen de la FAE o mediante técnicas de laboratorio que ayuden a seleccionar y utilizar espermatozoides con menor daño genómico y por tanto, de mejor calidad. Entre las estrategias clínicas disponibles se encuentra el PICS (Yagci et al., 2010), la microfluídica (Kocur et al., 2023), el MACS (Sánchez-Martín et al., 2017), el IMSI (Mangoli et al., 2020), tiempos más cortos de abstinencia (Agarwal, Gupta, et al., 2016) e incluso la utilización de espermatozoides testiculares.

Croncretamente, el uso de espermatozoides testiculares es obligatorio cuando el varón es diagnosticado con azoospermia. Sin embargo, su empleo también se ha propuesto recientemente como estrategia clínica en casos de varones con suficientes espermatozoides en el eyaculado pero que presentan valores elevados de FAE en los espermatozoides eyaculados (Alharbi et al., 2019; Arafa et al., 2018; S. C. Esteves et al., 2015; Greco, Scarselli, et al., 2005; Herrero et al., 2019; Pabuccu et al., 2017; J. Zhang et al., 2019), pero también en casos de infertilidad masculina grave, e incluso en parejas con

tratamientos de ICSI previos fallidos con semen eyaculado (Abhyankar et al., 2016; Al-Malki et al., 2017; Ben-Ami et al., 2013; Weissman et al., 2008), con el objetivo de mejorar los resultados clínicos y aumentar las probabilidades de embarazo. Los espermatozoides presentes en el eyaculado adquieren en su tránsito por el tracto reproductor masculino un mayor estado de madurez y potencial de fecundación (Vallet-Buisan et al., 2023). No obstante, los espermatozoides localizados en el testículo también son capaces de fecundar con éxito y dar lugar a un correcto desarrollo embrionario si han completado todas las etapas madurativas (Hourvitz et al., 1998; S. H. Lee et al., 2018; Oron et al., 2014).

Existen estudios previos en el que el cambio en la fuente de espermatozoides en parejas con fallos recurrentes de implantación, varios ciclos previos de FIV/ICSI sin éxito (Weissman et al., 2008), y con elevada FAE en eyaculado (Greco, Scarselli, et al., 2005) mejoró significativamente los resultados clínicos en cuanto a la tasa de gestación y reducción en la tasa de aborto con el uso de espermatozoides testiculares. Desde entonces, se han llevado a cabo diferentes estudios retrospectivos y prospectivos para evaluar el potencial de esta estrategia clínica (Alharbi et al., 2019; Al-Malki et al., 2017; Ben-Ami et al., 2013; Bradley et al., 2016; Herrero et al., 2019; Pabuccu et al., 2017; Weissman et al., 2008; J. Zhang et al., 2019).

Hasta la fecha, tal y como se ha expuesto previamente, se ha encontrado una mejora en los resultados reproductivos en cuanto a mayores tasas de gestación por transferencia embrionaria al mismo tiempo que se disminuye la probabilidad de aborto en las parejas con elevada FAE en el eyaculado cuando utilizan espermatozoides obtenidos mediante TESE para realizar un ciclo de ICSI. Esta estrategia clínica se ha estudiado principalmente en varones con elevada FAE y con ciclos previos de ICSI fallidos y/o con infertilidad masculina severa. El principio en el que se basa esta mejora de los resultados es el menor grado de FAE que tienen los espermatozoides del testículo en comparación con los del eyaculado, tal y como se ha demostrado empíricamente en modelos animales y en humanos (S. C. Esteves et al., 2015; Greco, Scarselli, et al., 2005; Moskovtsev et al., 2010; Suganuma et al., 2005; Xie et al., 2020). Tras su salida del testículo, aunque el tránsito epididimal favorezca la maduración final de los espermatozoides, estos quedan expuestos a sustancias nocivas y ERO que pueden afectar a la integridad de su genoma, originando las roturas y dando lugar a espermatozoides menos competentes para realizar su función (S. C. Esteves et al., 2020).

No obstante, se desconoce si esta mejora en los resultados clínicos proviene de factores citoplasmáticos o genéticos en los embriones obtenidos en consonancia con las características moleculares del espermatozoide utilizado. Hasta ahora, el uso de espermatozoides testiculares se ha asociado a un mayor riesgo de alteraciones cromosómicas en el embrión debido a una mayor tasa de aneuploidías presente en estos espermatozoides (Bernardini et al., 2000; Gianaroli et al., 2005; Rodrigo et al., 2011, 2019). La mayoría de los estudios que lo evaluaron fueron realizados en pacientes diagnosticados con azoospermia obstructiva y no obstructiva y comparados con los espermatozoides del eyaculado (Levron et al., 2001; Rodrigo et al., 2011; Vozdova et al., 2012). Son muy pocos autores han comparado la tasa de aneuploidías entre los espermatozoides del eyaculado y los extraídos del testículo de varones sin azoospermia, con conclusiones contrarias (Cheung S. et al., 2019; Moskovtsev et al., 2012). Esta laguna de conocimiento debería examinarse antes de recomendar esta práctica clínica a parejas con elevada FAE y con malos resultados reproductivos utilizando semen eyaculado.

Por ello, el objetivo de esta tesis es demostrar si la mejora de los resultados clínicos tras el uso de espermatozoides testiculares en parejas con elevada FAE en el eyaculado (y que además presentan oligozoospermia severa y/o fallos previos de ICSI) procede de un aumento en la cantidad de embriones euploides disponibles. Como los espermatozoides testiculares presentarían una fragmentación del ADN significativamente menor que los del eyaculado, también se relacionaría con un aumento en la proporción de embriones de buena calidad utilizables que cuando se utilizan espermatozoides del eyaculado, aumentando las probabilidades de éxito del ciclo.

Para abordar los objetivos planteados, se llevaron a cabo tres sub-estudios de diferente tipología, en primer lugar un análisis retrospectivo de datos clínicos disponibles en el registro de las clínicas IVIRMA de España, y posteriormente un análisis prospectivo de tipo aleatorizado controlado en ovocitos de la misma cohorte de parejas sometidas a un tratamiento de infertilidad a las que se les realizó esta intervención. Por último, se realizó un metaanálisis con toda la evidencia clínica disponible hasta el momento para estimar el efecto de esta estrategia clínica sobre las tasas clínicas de los pacientes.

En primera instancia, se evaluó retrospectivamente 54 ciclos de ICSI en los que también se realizó un PGT-A de 27 parejas, que tras el fracaso de al menos un ciclo con espermatozoides del eyaculado (E-ICSI) decidieron cambiar el origen del espermatozoide y someterse a un tratamiento ICSI con espermatozoides obtenidos del testículo (T-ICSI).

Los parámetros seminales de los varones incluidos en este estudio estaban por debajo de la normalidad, muchos de ellos diagnosticados con oligoastenoteratozoospermia y criptozoospermia. El análisis de los resultados reveló que en los ciclos con espermatozoides recuperados de los testículos el número de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto fue similar al de los ciclos de ICSI previos con semen eyaculado. Sin embargo, cuando se evaluó la calidad de estos se observó una mejora significativa en un 10% en la proporción de embriones de buena calidad en los ciclos T-ICSI según el número de ovocitos correctamente fecundado y el número total de blastocistos obtenidos. Cuando se evaluó la ploidía embrionaria, encontramos una tasa de aneuploidía comparable entre ambos ciclos en todos los enfoques calculados, por lo que podemos determinar que el uso de espermatozoides testiculares no aumentó la proporción de embriones aneuploides pero tampoco la disminuyó.

En este caso, un mayor número de embriones utilizables se manifestó en una mejora del pronóstico reproductivo de estas parejas, que habiendo fracasado en sus ciclos de ICSI previos con espermatozoides del eyaculado, 10 mujeres lograron una gestación clínica, y 8 dieron a luz al menos a un recién nacido sano. Estos resultados clínicos hallados en los ciclos de T-ICSI no se pudieron comparar con el ciclo E-ICSI realizado previamente debido al fracaso en todos ellos. Aunque al comparar un ciclo con malos resultados reproductivos con los obtenidos ahora puede constituir un sesgo, gracias a este diseño de estudio se nos permite controlar los factores de confusión típicos, ya que las pacientes sirvieron de su propio control. Dado que la edad de la mujer es uno de los factores más importantes a la hora de evaluar la aneuploidía embrionaria, en este caso no se observaron diferencias significativas entre la edad en los ciclos E-ICSI y T-ICSI, con sólo 0,8 años de diferencia entre ellos. La elección de analizar dos ciclos de ICSI más cercanos en el tiempo ayuda a minimizar el envejecimiento de los ovocitos de la paciente. Sin embargo, no podemos olvidar que la edad de la mujer en parejas mayores puede estar enmascarando este hallazgo a pesar del rendimiento del PGT-A, pero en ambos ciclos de ICSI.

Estudios previos también avalan una mejora en las oportunidades de obtener un recién nacido vivo cuando existe una infertilidad masculina severa, como una criptozoospermia o necrozoospermia tras el cambio a espermatozoides testiculares. Por ejemplo, los varones criptozoospermicos se beneficiaron del cambio al esperma recuperado de los testículos porque, aunque no hubo diferencias en la tasa de fecundación, se observó una tasa de implantación y embarazo significativamente mayor que en sus ciclos de ICSI

previos con espermatozoides eyaculados (Ben-Ami et al., 2013). Asimismo evaluaron la calidad de los embriones (sólo en los días 2 y 3 del desarrollo embrionario), pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. El metaanálisis de Kang et al., (2018) con 578 varones con criptozoospermia encontró un superior de gestación cuando usan espermatozoides testiculares comparados con los del eyaculado.

En otro estudio, pero en este caso la población de estudio presentaba necrozoospermia (Negri et al., 2014), los autores hallaron resultados significativamente superiores por ciclo en las parejas que utilizaron espermatozoides testiculares comparado con aquellas que continuaron utilizando espermatozoides del eyaculado en la tasa de implantación, gestación y de recién nacido vivo. Pero no se informó sobre la calidad de los embriones obtenidos y transferidos, aunque suponemos que la calidad de los embriones en el grupo T-ICSI es mejor debido a la superioridad de los resultados clínicos. Al mismo tiempo, también realizaron un sub-análisis teniendo en cuenta la edad de la mujer, encontrando que los resultados de gestación son significativamente más altos en mujeres jóvenes (menores a 35 años) que cuando son más mayores, aunque siempre fue una tasa superior en el grupo de espermatozoides testiculares. En nuestro caso, la edad de la mujer se encuentra por encima de los 35 años en ambos ciclos, lo cual también podría afectar a los resultados clínicos hallados.

Sin embargo, esta mejora no fue respaldada por el metaanálisis de Abhyankar de 5 estudios de cohortes (Abhyankar et al., 2016) en el que no se encontraron diferencias en las tasas de embarazo tras ICSI entre los grupos de espermatozoides testiculares y eyaculados de varones criozoospermicos. Posteriormente, otro estudio retrospectivo (Alharbi et al., 2020) realizado con 88 varones con diferentes grados de oligozoospermia severa y criptozoospermia que se sometieron a TESE para realizar la ICSI, hallaron que los varones con criptozoospermia (11 en total) son los que peores resultados reproductivos tenían y ninguno de ellos logró un embarazo, al contrario que el resto de parejas. Este resultado concuerda con otro estudio retrospectivo más reciente (Kendall Rauchfuss et al., 2021) con 32 parejas con oligozoospermia que utilizaron espermatozoides del eyaculado y 19 que utilizaron los testiculares para la ICSI. La tasa de fecundación fue significativamente más baja en estos últimos, obteniendo un número medio de blastocistos significativamente inferior. En este caso, tras el ajuste a potenciales variables de confusión, la probabilidad de recién nacido fue tres veces superior con el uso de espermatozoides eyaculados.

Para este análisis retrospectivo no fue posible conocer el grado de FAE de los varones incluidos en el estudio debido a la ausencia de esta información, por lo que no podemos establecer que la mejora de los resultados reproductivos en cuanto a la calidad de los embriones generados, y en consecuencia las gestaciones, esté relacionado directamente con este fenómeno. No obstante, ante una infertilidad masculina severa por baja concentración y motilidad espermática, el uso de espermatozoides obtenidos del testículo podría optimizar el pronóstico reproductivo aunque se necesitan estudios controlados y aleatorizados que comprueben si es cierto.

En segundo lugar, llevamos a cabo un estudio prospectivo aleatorizado controlado con pacientes con una FAE en el eyaculado superior al 30% y que presentaban infertilidad masculina severa (oligozoospermia) y/o tratamientos de ICSI previos fallidos. Hasta ahora no se ha publicado ningún estudio aleatorizado controlado en este tipo de pacientes que investigue si el uso de espermatozoides testiculares mejora los resultados clínicos. Además, los estudios que han abordado esta cuestión tampoco han tratado de dislucidar si el uso de espermatozoides testiculares aumenta la proporción de embriones cromosómicamente anormales, ya que se ha asociado una mayor tasa de aneuploidías en los espermatozoides del testículo (Bernardini et al., 2000; Rodrigo et al., 2011).

Para dar respuesta a esta cuestión, se han incluido seis parejas que iban a realizarse a un tratamiento mediante la técnica ICSI con ovocitos propios y semen propio eyaculado por factor masculino. Los varones con elevada FAE fueron sometidos a una TESE con el objetivo de utilizar los espermatozoides testiculares en la microinyección junto con los del eyaculado ante el supuesto de que los espermatozoides testiculares presentan menor grado de daño en su cromatina. En este punto, los ovocitos maduros obtenidos en la punción folicular fueron microinyectados de manera aleatoria o por un espermatozoide del eyaculado o por uno del testículo, lo que permite comparar los resultados de laboratorio de manera intra-paciente y nos da la oportunidad de evitar los sesgos que pudieran haber entre las parejas incluidas.

En primer lugar, medimos la fragmentación del ADN de ambas muestras seminales el mismo día de la ICSI tras su descongelación para comprobar si el nivel de FAE de los espermatozoides testiculares es menor a los del eyaculado. A pesar de que no fue estadísticamente significativa, la FAE de los espermatozoides del testículo fue un 13% menor a los del eyaculado, lo que está de acuerdo con los estudios anteriormente realizados (Alharbi et al., 2019; S. C. Esteves et al., 2015; Greco, Scarselli, et al., 2005;

Herrero et al., 2019; Pabuccu et al., 2017; Xie et al., 2020). No obstante, se debe mencionar que el proceso de congelación/descongelación puede acarrear un incremento en el porcentaje de fragmentación en los espermatozoides (Di Santo et al., 2012; Gouhier et al., 2023). En nuestro caso, los varones presentaron una FAE de los espermatozoides del eyaculado media para entrar al estudio de un 44%, mientras que la FAE media de los espermatozoides del eyaculado descongelados para la ICSI ascendió hasta un 58%. Este aumento puede venir dado por el proceso de congelación o también estar influenciado por las oscilaciones en la calidad seminal que presentan los varones de manera natural. No obstante, como el proceso de congelación/descongelación se realiza en los dos tipos de muestras utilizadas en la ICSI, el efecto dañino sería por igual en ambos grupos. También cabe reseñar que en esta población de estudio el valor medio de la FAE de los espermatozoides testiculares es alto si lo comparamos con el punto de corte que nosotros establecimos en los criterios de inclusión, aunque siempre fue menor que en los procedentes del eyaculado, lo cual confirma uno de nuestros objetivos. A pesar de que en ambos grupos se utilizaron potencialmente espermatozoides con ADN fragmentado, los espermatozoides del testículo tendrían que tener un mejor rendimiento al tener más íntegra su cromatina según nuestra hipótesis.

Tras la microinyección de los ovocitos, la tasa de fecundación fue más alta para el grupo E-ICSI aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Tras la evaluación de los embriones durante el desarrollo embrionario, la calidad en día 3 no se vio afectada por el origen del espermatozoide, llegando a estadio de blastocisto un número muy similar de embriones en cada grupo, 10 en el grupo T-ICSI y 11 en E-ICSI. Pero, cuando se evaluó la calidad de los blastocistos, encontramos un mayor número de embriones de buena calidad (A+B) en el grupo de espermatozoides testiculares, lo que está de acuerdo con nuestro hallazgo en el estudio previo, aunque en este caso debido al bajo número de embriones la diferencia no fue estadísticamente significativa.

En este punto conviene destacar que esta tasa la calculamos desde tres enfoques diferentes para valorar la función del espermatozoide desde el momento de la microinyección. Aunque en este caso el espermatozoide del testículo tenga un poder de fecundación un poco más bajo, el desarrollo posterior de los cigotos no se ve afectado al llegar prácticamente el mismo número de embriones a estadio de blastocisto en ambos grupos. Además, con la activación del genoma embrionario en el tercer día de desarrollo, los posibles defectos paternos salen a la luz pudiendo bloquear el desarrollo embrionario

(Tesarik et al., 2004). En este caso no se observa esta consecuencia por factor masculino, sino al contrario, se obtienen más blastocistos de buena calidad en el grupo T-ICSI. Esto nos indica un mayor rendimiento del espermatozoide testicular en comparación con los del eyaculado en este tipo de pacientes, ya que se obtiene número superior de embriones utilizables.

Solamente el estudio de Gilman et al., (2018) demostró una mejora significativa de la calidad embrionaria en día 5 en los ciclos de ICSI con espermatozoides testiculares aunque los espermatozoides recuperados del testículo no mejoraron las tasas de embarazo, aborto y de nacidos vivos de pacientes con un fracaso previo de TRA y sin conocimiento de su grado de FAE, si bien en estas parejas las mujeres presentaban una respuesta ovárica deficiente lo que puede afectar al resultado reproductivo. En nuestro estudio, la edad de la mujer fue menor a 35 años y todas presentaban buena reserva ovárica, siendo más limitante en este caso los parámetros seminales de los varones. Otros estudios, como el de S. C. Esteves et al., (2015) solo comparó la calidad de los embriones en día 3 de desarrollo embrionario, momento en el cual realizaron las transferencias embrionarias, pero si que encontraron una pequeña diferencia en la tasa de buena calidad a favor del grupo T-ICSI, al igual que su momento Greco, Scarselli, et al. (2005). Otros estudios, simplemente no informan sobre la calidad embrionaria de los embriones transferidos ni el día en el que se realizó (Alharbi et al., 2019; Herrero et al., 2019; Mehta et al., 2015; Pabuccu et al., 2017), lo que condiciona poder comparar nuestros hallazgos.

Por otra parte, considerando el mayor riesgo de portar aneuploidías cromosómicas que tendrían los espermatozoides testiculares, se realizó un PGT-A a los embriones aptos para ello y al mismo tiempo, se analizó cromosómicamente mediante FISH a los espermatozoides de ambas muestras utilizadas en la ICSI, eyaculado y testicular para comparar la tasa de aneuploidías espermáticas. Como hasta la fecha ningún otro estudio publicado ha examinado esta cuestión, esta información es muy útil de cara a recomendar esta práctica clínica a los pacientes en un futuro.

En lo que respecta a la ploidía embrionaria, esta población obtuvo una tasa de euploidía media de 61,9% (13/21), y concretamente para cada grupo, la diferencia fue tan solo de un 3% entre el grupo T-ICSI (60%) y E-ICSI (63%). De hecho, a pesar de esta pequeña diferencia a favor del grupo E-ICSI, el grupo T-ICSI presentó menos embriones aneuploides y una proporción más alta de embriones mosaico que el otro, aunque estas diferencias no fueron en ningún momento estadísticamente significativas. La similitud en

las tasas de euploidía entre ambos tipos de ciclos concuerda con nuestros resultados previos del estudio retrospectivo y con los resultados publicados en la ESHRE en 2019 con un tamaño muestral mucho mayor (Figueira R CJ et al., 2019), en el que tras el análisis de 940 muestras de TE de 362 parejas con elevada FAE en el eyaculado (280 de ellas se realizaron un ICSI con espermatozoides eyaculados propios y 82 parejas un ICSI con espermatozoides testiculares) hallaron una tasa de euploidía por ovocito metafase II comparable entre ambos grupos, 18,7% vs 18,3%, respectivamente.

Aunque con estos datos no podemos confirmar el objetivo principal de esta tesis (un aumento del 15% de embriones euploides disponibles para transferir en el grupo T-ICSI), podemos afirmar en primera instancia que el uso de espermatozoides testiculares no incrementa la proporción de embriones aneuploides en la pareja. Es posible que la dificultad de encontrar una mayor diferencia entre ambos grupos pudiera ser el pequeño tamaño muestral que disponemos, ya que esta comparación se realizó sobre 21 blastocistos.

No obstante, asimismo debemos considerar en este punto el impacto que tiene la edad de la mujer sobre la aneuploidías embrionarias (Pellestor et al., 2006), ya que podría estar influyendo en los resultados obtenidos. En este caso, las mujeres participantes del estudio son jóvenes, con una edad media de 32 años, por lo que el riesgo de aneuploidías por edad materna avanzada es reducido (Mikwar et al., 2020).

En cambio, la información disponible del análisis cromosómico de los espermatozoides mediante FISH es más limitada debido a la falta de diagnóstico en cuatro varones en sus muestras de TESE. Debido a que en las muestras de biopsia testicular no se obtiene un número elevado de espermatozoides y presentan mucho debris celular, la capacidad de realizar un FISH se reduce. No obstante, el resultado de FISH de las muestras de espermatozoides eyaculados fue en su mayoría alterado para los cinco cromosomas evaluados, e igualmente para las dos muestras de espermatozoides testiculares. Comunmente, se ha encontrado una mayor incidencia de aneuploidías en los espermatozoides del testículo de varones con azoospermia cuando se comparaban con los espermatozoides del eyaculado de controles fértiles (G. D. Palermo et al., 2002; Vozdova et al., 2012), aunque también se ha encontrado mayor número de alteraciones cromosómicas cuando existe baja concentración espermática y con infertilidad masculina severa, siendo más evidente cuanto más oligozoospermico es el varón (Gianaroli et al., 2005; Rodrigo et al., 2019).

Nuestros resultados se corresponderían con este hallazgo, ya que los varones incluidos en este estudio presentan oligozoospermia severa y baja calidad seminal. Además, Moskvovtsev et al., (2012), a pesar de observar una FAE significativamente inferior en los espermatozoides testiculares, también encontró una mayor tasa de aneuploidías en los espermatozoides del testículo cuando la comparó con la frecuencia de aneuploidías en el espermatozoides eyaculado en ocho varones con alta FAE. En cambio, Cheung S. et al., (2019) en su estudio más reciente encontró que la tasa de aneuploidías espermáticas es más baja en los testiculares que en los del eyaculado en los mismos varones (aunque este análisis lo realizó solamente sobre 3 sujetos). En este caso, realizó el examen mediante FISH de 9 cromosomas y NGS, una prueba con mucha más capacidad diagnóstica que el FISH. Es posible que nuestros resultados estén limitados con la realización de un FISH de solo 5 cromosomas, pero es una técnica habitual aconsejada para evaluar la tasa de aneuploidías en los espermatozoides cuando existe un espermiograma alterado y malos resultados reproductivos previos (Rodrigo et al., 2019). Por otra parte, otros autores han hallado una correlación positiva entre los niveles de FAE y las aneuploidías espermáticas, aunque el mecanismo mediante el cual están vinculados debería ser estudiado más en profundidad, pudiendo ser que las alteraciones cromosómicas desencadenen las roturas en el ADN (Muriel et al., 2007; Vendrell et al., 2014).

Sin embargo, también existen otras técnicas de selección espermática que disminuirían la proporción de espermatozoides portadores de aneuploidías para varones con un resultado de FISH alterado. La técnica MACS parece reducir la tasa de aneuploidías en la muestra elucidada (Esbert et al., 2017), al igual que reduciría el porcentaje de FAE en estos espermatozoides (Pacheco et al., 2020; Vendrell et al., 2014). También la última técnica desarrollada, la microfluídica, permitiría obtener una muestra de espermatozoides procesada con menor daño genómico que tras la aplicación del gradiente de densidad para preparar la muestra o que en el eyaculado fresco, tal y como se presentó en un estudio reciente (Kocur et al., 2023). En este caso, la población de estudio también encontró una mejora en la proporción de embriones euploides en el nuevo ciclo de ICSI con microfluídica al compararlo con su ciclo anterior con el procesamiento de semen habitual, aunque los autores no comprobaron explícitamente la tasa de aneuploidías espermáticas de la muestra recogida. No obstante, estas técnicas de selección espermática solo pueden ser aplicadas sobre muestras de semen eyaculadas con una concentración de

espermatozoides adecuada, no pudiendo realizarse sobre muestras seminales muy pobres en concentración como son las que nos atañen en este trabajo.

También se evaluaron los resultados clínicos tras las transferencias de los embriones que resultaron euploides. Se realizaron seis transferencias embrionarias en total, cuatro de ellas dieron lugar a una gestación (la tasa media fue 66,7%). En el momento del análisis de datos, dos de las gestaciones finalizaron con el nacimiento de un recién nacido sano, pero actualmente desconocemos el resultado de las otras dos aunque ninguna paciente había abortado hasta el momento.

Si consideramos a qué grupo pertenecía cada embrión transferido, se realizaron tres transferencias por cada grupo de estudio. Solo una de las transferencias realizadas con embriones del grupo E-ICSI dio lugar a un embarazo (30%), que resultó en un recién nacido. En cambio, las tres transferencias del grupo T-ICSI dieron lugar gestaciones (100%), por lo que los embriones procedentes de espermatozoides del testículo implantaron mejor que los del otro grupo y dieron lugar a embarazos evolutivos. Y aunque tengamos la misma tasa de recién nacido vivo en ambos grupos, solo conocemos el resultado de una de las gestaciones del grupo T-ICSI, ya que en el momento de analizar los datos las otras dos gestaciones eran evolutivas y esperamos que hayan finalizado de la manera adecuada. La falta de estos datos delimita las conclusiones finales que podamos establecer sobre la probabilidad de tener recién nacido vivo con el uso de espermatozoides testiculares, si bien podríamos concluir que existe un mejor pronóstico de embarazo con el cambio a espermatozoides testiculares, y que esta mejora puede derivar del menor nivel de FAE que presentan.

Los resultados que hemos encontrado en pro del uso de espermatozoides testiculares en parejas con elevada FAE concuerdan con los resultados de estudios previos. En un primer estudio retrospectivo (Mehta et al., 2015), doce de las veinticuatro parejas con FAE, oligozoospermia y con ciclo de ICSI previo fallido, obtuvieron un embarazo que finalizó con el nacimiento de un niño sano tras el cambio a espermatozoides testiculares en el siguiente ciclo de ICSI. No obstante, este autor incluyó a varones con una $F AE > 7\%$, valor que actualmente no se consideraría elevado, pero aún así hallaron una mejora en los resultados reproductivos. Igualmente, S. C. Esteves et al., (2015) realizaron un estudio de cohortes prospectivo con 147 parejas que realizaban su primer ICSI por factor masculino, por oligozoospermia y una $F AE > 30\%$ en el eyaculado, que son los mismos criterios que nuestra población de estudio. En este caso, el nivel de FAE también fue

significativamente inferior en los espermatozoides del testículo respecto a los del eyaculado. Cuando compararon los resultados clínicos, las parejas que utilizaron espermatozoides del testículo (n=81) obtuvieron una mejora significativa en la tasa de gestación clínica y en la de recién nacido vivo por transferencia embrionaria, disminuyendo significativamente la proporción de abortos, en comparación con las parejas que realizaron su tratamiento con espermatozoides del eyaculado (n=91). También, dos estudios prospectivos posteriores (Arafa et al., 2018; Pabuccu et al., 2017) en los que participaron parejas con FAE>30% en el eyaculado y con al menos un ciclo de ICSI previo sin éxito, el cambio del origen del espermatozoide causó una mejora significativa en la gestación clínica y evolutiva por ciclo, y un descenso en la tasa de aborto. Aunque en el caso de Arafa et al., (2018) no midieron la FAE en los espermatozoides recuperados del testículo, por lo que no pudieron confirmar que esta mejora viniera dada por una reducción en la FAE de los espermatozoides de los ciclos T-ICSI.

También se ratifican con el interesante estudio retrospectivo de Herrero et al., (2019), en el que incluyeron 145 parejas con elevada FAE en el eyaculado con dos ciclos previos de ICSI sin recién nacido con espermatozoides eyaculados. Del total de parejas, 77 parejas cambiaron a espermatozoides testiculares con menor grado de FAE y 68 continuaron con el semen eyaculado como grupo control, obteniendo las primeras una tasa de embarazo clínico por transferencia significativamente superior al otro grupo, y una tasa acumulada de recién nacido vivo un 12% superior al tratamiento habitual. De hecho, cuando subdividieron a la población de estudio en función de si tenían FAE alta o baja (según $\geq 36\%$ por TUNEL o $\geq 25\%$ por SCSA), obtuvieron mejores resultados reproductivos las parejas que realizaron T-ICSI. Igualmente, cuando realizaron un subanálisis en base a los parámetros seminales, de entre los varones con oligoastenoteratozoospermia, los que cambiaron a T-ICSI obtuvieron mejores resultados clínicos (la tasa acumulada de recién nacido fue significativamente mejor (28%) que los que repitieron el tratamiento con espermatozoides del eyaculado (6.7%) ($p < 0,01$)). Mientras, entre los varones normozoospermicos, el grupo T-ICSI obtuvo una ligera mejora de las tasas clínicas aunque de manera no significativa respecto al tratamiento E-ICSI.

En la misma línea, otros dos estudios realizados en 2019 también encontraron una mejora en la proporción de gestaciones en las parejas con elevada FAE (siempre superior al 30%) que decidieron realizarse un ICSI con espermatozoides testiculares en comparación con

las que optaron por el tratamiento estándar con los del eyaculado (Alharbi et al., 2019; J. Zhang et al., 2019). En el primero (Alharbi et al., 2019), cuando compararon las parejas con una FAE>30%, la tasa de gestación clínica por transferencia fue superior, aunque no significativa, en el grupo T-ICSI que en el grupo E-ICSI, pero esta diferencia no fue tan evidente cuando los varones tenían un nivel de FAE menor. Igualmente, el estudio prospectivo de Zhang et al., (2019), con el mismo diseño que el anterior de S. C. Esteves et al., 2015, reclutó 102 parejas con FAE>30% en el eyaculado que se sometieron a su primer ICSI o bien con espermatozoides extraídos del testículo o con espermatozoides del eyaculado. A pesar de que la tasa de fecundación fue similar para ambos, el grupo que utilizó espermatozoides testiculares fue el que obtuvo una mayor tasa de embarazo y de parto con recién nacido vivo que aquellos que utilizaron semen eyaculado. Este grupo tampoco midió el grado de FAE en los espermatozoides testiculares, por lo que no se puede confirmar que los hallazgos estén justificados por una menor FAE.

En cambio, en los resultados de un ensayo aleatorizado y controlado presentado como comunicación en la ESHRE (Hozain M. et al., 2018) no encontraron una mejora significativa de los resultados reproductivos con el uso de espermatozoides testiculares. Aunque un número elevado de parejas con FAE>20% fueron asignadas aleatoriamente al grupo T-ICSI (n=53) o E-ICSI (n=58), el nivel de FAE en ambos tipos de espermatozoides fue similar, 26,7% en los testiculares y 23,8% en los eyaculados (p=0.7); la tasa de fecundación y de llegada a blastocisto fue más alta en el grupo E-ICSI, pero estos resultados están sesgados porque se hicieron más transferencias en día 3 en el grupo T-ICSI que en el E-ICSI, por lo que se desconoce el resultado de estos embriones. Pese a ello, las tasas de gestación, gestación evolutiva y aborto fueron comparables entre ambos grupos, no encontrándose ninguna diferencia significativa, por lo que los embriones del grupo T-ICSI presentaron el mismo potencial evolutivo e implantatorio.

Estos resultados revalidan que esta estrategia clínica supone un beneficio principalmente para los varones con elevada FAE en el eyaculado y malos parámetros seminales más que en los pacientes con una calidad seminal normal y/o baja FAE. Podemos decir que la causa de esta premisa se sustenta en que los espermatozoides testiculares tienen la cromatina menos dañada que los procedentes del eyaculado, lo que favorecería la obtención de embriones de mejor calidad y por tanto, con más probabilidades de dar lugar a un recién nacido vivo.

Cabe destacar que todos los estudios realizados hasta la fecha, a pesar de los resultados relevantes, son de tipo observacional, y se realizaron o bien en dos grupos de pacientes no aleatorizados (S. C. Esteves et al., 2015; Herrero et al., 2019; Pabuccu et al., 2017; J. Zhang et al., 2019), lo que podría dar lugar a un sesgo de selección que podría influir en los resultados encontrados, ya que en ningún estudio hicieron un análisis ajustado a posibles variables de confusión; o bien son de tipo casos-cruzados (Alharbi et al., 2019; Arafa et al., 2018; Greco, Scarselli, et al., 2005; Mehta et al., 2015), siendo el ciclo con esperma eyaculado el precedente del ciclo con espermatozoides del testículo (ya que el fallo de ICSI previo era criterio de inclusión en algunos de ellos). Con este método los pacientes sirven como su propio control, reduciendo los posibles factores de confusión aunque el paso del tiempo entre un ciclo y otro puede afectar a la calidad ovocitaria. Por el contrario, para este estudio realizamos una asignación aleatoria de los ovocitos de una misma paciente para ser inseminados por cada tipo de espermatozoide, generando dos grupos de estudio para cada paciente, controlando así todos los posibles sesgos que existan entre diferentes parejas. Este diseño experimental no se ha realizado nunca hasta ahora, y de este modo podemos evaluar el efecto del origen del espermatozoide estandarizando el resto de variables clínicas que pudieran influenciar en los resultados clínicos. Además, la evaluación de los embriones en cultivo embrionario y la selección de los mejores para la transferencia se realizó en ciego, ya que el personal de laboratorio, menos una persona, desconocían a qué grupo pertenecía cada embrión.

Por último, una forma de confirmar los hallazgos clínicos encontrados en la comunidad científica es mediante un metaanálisis. Para ello, realizamos una búsqueda por diferentes plataformas para encontrar todos los estudios que hayan evaluado esta estrategia clínica. Aquellos estudios que cumplieron con nuestros criterios de inclusión y que se realizaron en una población similar a la nuestra fueron incluidos. Hasta la fecha existen dos revisiones sistemáticas y metaanálisis que resumen la evidencia actualmente disponible sobre la T-ICSI en hombres con alta FAE en semen eyaculado (S. C. Esteves et al., 2015; Yu et al., 2021). Nosotros hemos tomado como punto de referencia para incluir estudios con los mismos criterios de inclusión la realizada por S. C. Esteves, Roque, et al., (2017) y hemos aumentado el número de estudios que incluyeron desde que se realizó para incrementar la potencia estadística y consolidar los resultados hallados. El metaanálisis realizado por Yu et al., (2021) difiere un poco en los estudios incluidos y por tanto en las poblaciones evaluadas; incluyeron estudios en los que la población de estudio había

tenido al menos un fallo de ICSI previo, estableciendo un subgrupo con elevada FAE en el eyaculado y otro subgrupo de varones no seleccionados, es decir, estudios en los que el cambio a T-ICSI no fue basado en tener una elevada FAE y los varones podrían tener parámetros seminales normales o anormales.

La población objeto de nuestro estudio son varones con elevada FAE en el eyaculado que se someten a un T-ICSI con la premisa de que el espermatozoides testiculares presenta menor grado de daño en su genoma y por tanto, su uso supondrá una mejora en sus resultados clínicos. Por ello, en primer lugar comprobamos la diferencia en el nivel de fragmentación del ADN entre los espermatozoides del testículo y los del eyaculado en 547 muestras de espermatozoides de estos varones. Hemos encontrado una tasa significativamente menor de FAE a nivel testicular que en los espermatozoides del eyaculado. Sin embargo, el análisis global denota una alta heterogeneidad entre los estudios incluidos, que puede derivar de las diferentes técnicas utilizadas para medir la FAE y la diversidad en las poblaciones estudiada. Por ello, se realizó un sub-análisis en función de las técnicas empleadas. En este caso, el tamaño del efecto es similar entre las técnicas TUNEL y SCD, pero en ambos subgrupos encontramos una FAE significativamente menor en los espermatozoides testiculares, pero cabe destacar que continúa existiendo una alta heterogeneidad en las mediciones realizadas con SCD.

Además, el análisis *funnel plot* revela cierto sesgo de publicación al no haber incluido estudios más pequeños en el análisis, ya que casi todos se concentran en la misma área. No obstante, la disparidad en los resultados puede deberse a que el ensayo TUNEL mide las roturas en el ADN de manera directa, mientras que la SCD lo hace indirectamente mediante la desnaturalización del ADN, por lo que los resultados medidos mediante diferentes pruebas no deberían ser comparables. También puede estar influyendo la inclusión de los pacientes para cada estudio, ya que existe mucha controversia sobre el umbral que debe adoptarse clínicamente para indicar una FAE elevada, ya que entre los estudios incluidos encontramos valores desde el 7% (Mehta et al., 2015), 15% (Greco, Scarselli, et al., 2005), y 30% (S. C. Esteves et al., 2015; Moskovtsev et al., 2012, y en el nuestro) como FAE alta.

Por otra parte, analizamos el efecto del cambio de espermatozoide sobre las tasas clínicas de fecundación, gestación clínica, aborto y recién nacido vivo. En este caso, también realizamos un análisis del efecto global y para reducir la heterogeneidad presente, establecimos dos subgrupos en base a dos características principales de la población de

los estudios incluidos: parámetros seminales alterados (oligozoospermia) pero sin fallos previos de ICSI, o parámetros seminales normales (normozoospermia) y fallos previos de ICSI, pero todos ellos con FAE elevada.

El análisis muestra una tendencia a tasas de fecundación más bajas con la T-ICSI, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (al igual que S. C. Esteves, Roque, et al., 2017). Tras el análisis por subgrupos, la heterogeneidad se disminuye a cero en el grupo oligozoospermia y no fallos de ICSI, lo cual indica que la división en estos grupos es un buen acercamiento estadístico para interpretar los resultados obtenidos. En este caso, en el primer grupo el cambio a espermatozoides testiculares no favorece la tasa de fecundación; en cambio, en el grupo normozoospermico con fallos de ICSI no existe esta asociación, encontrando resultados más dispares entre los estudios incluidos, y sin diferencias significativas en la tasa de fecundación. Tampoco encontraron una relación significativa en Yu et al., (2021) en la tasa de fecundación de los dos subgrupos con una heterogeneidad nula.

En cambio, hallamos una mejora significativa en la tasa de gestación clínica con el uso de espermatozoides testiculares, tanto en la población en general como cuando lo analizamos por subgrupos, siendo el efecto más pronunciado en los varones con fallos de ICSI que en los oligozoospermicos (lo que está de acuerdo con el hallazgo de S. C. Esteves et al., 2015). En concordancia, también se encontró una probabilidad de gestación mayor con el uso de espermatozoides testiculares en Yu et al., (2021), siendo este efecto más evidente en la población que tiene alta FAE y fallos de ICSI. En cambio, esta asociación no fue significativa en varones no seleccionados. En nuestro caso, la heterogeneidad es baja en el análisis global y en el análisis del subgrupo de varones normozoospermicos y con fallos de ICSI, no siendo así en el grupo de oligozoospermicos, aunque este valor I^2 no es muy alto. Esta consecuencia podría derivar de la falta de diversidad en los estudios incluidos tal y como se observa en el gráfico *funnel*, ya que en este caso son solo dos y pueden existir más sesgos clínicos, frente a los del otro subgrupo que son cinco.

El uso de espermatozoides testiculares también se asoció con una menor riesgo de aborto en parejas con elevada FAE, encontrandose una diferencia estadísticamente significativa, además con una heterogeneidad igual a cero, lo que fortalece el resultado hallado. En este caso, el tamaño del efecto es similar para ambos subgrupos, pero de nuevo es el subgrupo

de varones con oligozoospermia el que presenta heterogeneidad, que puede derivar de sesgos internos en los dos estudios incluidos en esta sección.

Finalmente, de acuerdo con los resultados hallados anteriormente, el uso de espermatozoides testiculares también favorece significativamente la tasa de recién nacido vivo en esta población. En este caso, en el subgrupo de varones con oligozoospermia la heterogeneidad que presenta es nula y el uso de espermatozoides testiculares aumenta significativamente las probabilidades de recién nacido. Por el contrario, en el subgrupo de varones normozoospermicos y fallos repetidos de ICSI el efecto es aún mayor pero de manera no significativa, lo que puede estar relacionado con la heterogeneidad que presenta esta comparación. Del mismo modo, en Yu et al., (2021) encontraron que la tasa de recién nacido vivo incrementa significativamente con el uso de espermatozoides testiculares, pero en particular este efecto se evidenció en el subgrupo de varones con alta FAE y no en varones no seleccionados, aunque este análisis presentó alta heterogeneidad seguramente debida a algún sesgo en los estudios de este subgrupo.

Estos resultados aportan pruebas directas de que la utilización de espermatozoides extraídos del testículo en casos de FAE elevada con semen eyaculado puede aumentar la probabilidad de seleccionar espermatozoides con menor daño en el ADN para la ICSI, siendo el efecto más notorio en varones con fallos previos de ICSI que con oligozoospermia. Dado que la fecundación de un ovocito por un espermatozoide testicular con la cromatina menos dañada puede mejorar las posibilidades de obtener un embrión con el genoma intacto, también puede aumentar la probabilidad de embarazo y de nacidos vivos.

Consideraciones finales

Existen numerosos estudios que comparan los resultados reproductivos de ciclos con espermatozoides testiculares frente al eyaculado para la ICSI en varones sin azoospermia, bien sea por una elevada fragmentación del ADN de los espermatozoides del eyaculado o por infertilidad masculina severa, factores relacionados con peores tasas clínicas, y por tanto, peor pronóstico reproductivo.

La evidencia actual sostiene que la tasa de embarazo incrementa y se reduce la tasa de aborto, aumentando la probabilidad de recién nacido vivo, con el uso de espermatozoides testiculares. En principio, los datos podrían considerarse suficientes para justificar su uso

en estos pacientes para lograr mejores resultados de ICSI. Sin embargo, es importante considerar qué tipo de pacientes son los más beneficiados de esta estrategia ya que implica una intervención quirúrgica como es una biopsia testicular.

La biopsia testicular, como la TESE/TESA, conlleva una intervención quirúrgica que puede tener complicaciones. Se han descrito complicaciones durante o después de la intervención como dolor, inflamación, hematomas o infecciones (Zini et al., 2017) que pueden derivar en una alteración de la función testicular momentánea o duradera, y pudiendo desencadenar deterioro de la función testicular o hipogonadismo (Eliveld et al., 2018). Aunque se trate de varones con función espermática normal y la tasa de recuperación espermática tras la biopsia sea alta, los pacientes deben tener conocimiento de los riesgos asociados al optar por una intervención testicular teniendo espermatozoides en el eyaculado.

Además, existen datos controvertidos sobre el aumento en la tasa de aneuploidía en los espermatozoides procedentes del testículo y en casos de infertilidad masculina severa. También se ha documentado una correlación entre la FAE y la presencia de aneuploidías cromosómicas, aunque pudiera ser que errores en la meiosis de los espermatozoides relacionados con las aneuploidías cromosómicas serían las causantes de las roturas en el ADN (Muriel et al., 2007; Vendrell et al., 2014). De todas formas, si bien nosotros hayamos observado de manera retrospectiva y prospectiva la misma proporción de embriones euploides en los ciclos de ICSI con espermatozoides eyaculados como con espermatozoides testiculares, la evidencia es aún insuficiente y se debería explorar este hecho con estudios bien diseñados y de mayor tamaño muestral, ya que nuestros resultados están obtenidos en pequeños grupos de pacientes. Mientras tanto, las parejas que opten por este tratamiento deben ser asesoradas adecuadamente por sus clínicos, siendo altamente recomendable realizar un PGT-A a los embriones generados con el objetivo de aumentar la seguridad del tratamiento al transferir embriones cromosómicamente normales. Este procedimiento incrementaría el coste total del tratamiento, por lo tanto, los pacientes deberían ser aconsejados convenientemente valorando el coste-beneficio de ello con el fin de obtener un bebé sano en casa.

Por lo cual, es muy importante identificar la población diana a la que ofrecer esta estrategia clínica. Los estudios realizados hasta ahora son en su mayoría observacionales, y algunos de ellos tienen diseño de casos-cruzados, en los que el paciente actúa como su propio control, lo que limita la validez de los resultados obtenidos. En base a los

metaanálisis realizados, estudios de máxima evidencia científica, los pacientes que más ventajas obtendrían del cambio a espermatozoides testiculares serían aquellos que tengan una FAE en el espermatozoides eyaculado elevada e intentos previos de ICSI fallidos, aunque aquellos con oligozoospermia y elevada FAE también mejorarían sus resultados clínicos.

No obstante, cabe resaltar que la dificultad para encontrar resultados concluyentes proviene de la heterogeneidad en estos estudios en general, ya que presentan diferentes diseños, poblaciones de estudio diversas respecto a su grado de infertilidad masculina, número de ciclos de ICSI previos fallidos, edad de la mujer, los protocolos utilizados para la estimulación ovárica, y el método para medir la FAE empleado. Existen numerosas pruebas para medir la FAE, y la metodología que emplean y la forma de medir las roturas difiere entre ellas. Además, no existe un acuerdo entre los clínicos para establecer un valor umbral de FAE patológico correlacionado con malos resultados reproductivos, por lo tanto, es muy diferente el punto de corte establecido como FAE alta en los sujetos de cada estudio publicado, aunque la mayoría la reconozca a partir del 30%. En nuestro caso, la mejora en los resultados clínicos se ha evaluado en varones con una FAE superior al 30% por SCD, pero no podemos asegurar que se encontrará el mismo resultado clínico si la FAE fuese más baja, o si hubiese sido medida mediante otro método.

Además, para este estudio no fue determinante el factor causante de la fragmentación en los pacientes para su inclusión, ya que la limitación era simplemente tener una FAE > 30%. Entre los diferentes factores desencadenantes de FAE, algunos de ellos, sobre todo los post-testiculares, pueden ser modificables en un intento de reducir sus niveles, tal y como es el tabaquismo, el varicocele, o la presencia de infecciones que aumentan los niveles de EO. Ante el diagnóstico de elevada FAE y su posible etiología, existen diferentes mecanismos de actuación con el objetivo de disminuir el porcentaje de espermatozoides con la cromatina dañada en el eyaculado antes de optar por una intervención quirúrgica como es una biopsia testicular (Agarwal, Cho, et al., 2016; Agarwal et al., 2014; Majzoub et al., 2017; Romano et al., 2023; Roque & Esteves, 2018). Sin embargo, el tiempo requerido para ello puede ser largo o que el resultado de la terapia no sea el adecuado, utilizando espermatozoides con elevada FAE para el tratamiento. Aunque para obtener espermatozoides testiculares sea necesario una intervención, ante la evidencia encontrada, sabemos que estos espermatozoides presentan menor daño cromosómico que los del eyaculado, lo que mejora el pronóstico reproductivo de estos pacientes.

También es importante conocer el efecto del tiempo de abstinencia en los niveles de FAE a la hora de obtener la muestra para la TRA. Periodos más cortos parecen estar relacionados con menor FAE y diversos estudios han hallado una mejora de los resultados clínicos (Agarwal, Gupta, et al., 2016; Marshburn et al., 2010; Sánchez-Martín et al., 2013) En nuestro caso, recomendamos a nuestros pacientes realizar la recogida de la muestra con un periodo de abstinencia de entre 2-5 días, siguiendo el protocolo clínico. Tal vez, la recomendación de dejar uno o dos días de abstinencia a la hora de recoger la muestra hubiera resultado en niveles de FAE más bajos en el eyaculado, no siendo tan notoria la diferencia en la FAE entre ambos tipos de espermatozoides. Sería conveniente considerarlo en el futuro.

Tampoco podemos olvidar el papel determinante del ovocito en el éxito reproductivo, ya que se ha observado que la capacidad reparadora de las roturas en el ADN depende en gran medida de la edad ovocitaria y su calidad (Horta et al., 2020; Meseguer et al., 2011), por lo tanto, el efecto que pueda tener el espermatozoide con la cromatina dañada en el desarrollo embrionario posterior también va a variar en función de la competencia ovocitaria. También juega un papel determinante la edad de la mujer en la ploidía embrionaria (Mikwar et al., 2020; Pellestor et al., 2006), por lo que los beneficios encontrados de esta estrategia podrían verse menoscabados en poblaciones femeninas más añosas, ya que en este estudio se han incluido mujeres jóvenes con buena respuesta ovárica. En la decisión de cambiar a espermatozoides testiculares se debería considerar el número de ovocitos a recuperar, ya que la combinación de un número bajo de ovocitos por edad avanzada y/o mala calidad ovocitaria podría reducir las tasas de fecundación y poner en peligro la posibilidades de disponer de embriones para la transferencia.

CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir que en varones con una FAE en el eyaculado mayor al 30%, oligozoospermia y/o fallos de ICSI previos:

- La tasa de euploidía embrionaria no aumenta por el uso de espermatozoides testiculares, sino que es comparable a la tasa obtenida con espermatozoides del eyaculado. Sin embargo, son necesarios más estudios con tamaños muestrales mayores que confirmen este hallazgo.
- El nivel de fragmentación del ADN de los espermatozoides testiculares es menor que en los espermatozoides procedentes del eyaculado.
- Aunque los espermatozoides testiculares tengan una tasa de fecundación ligeramente más baja, esto no afecta al desarrollo de los embriones en cultivo, obteniendo tasas de llegada a blastocisto similares a los embriones de espermatozoides eyaculado. No obstante, se obtuvo una proporción de blastocistos de buena calidad mayor con el uso de espermatozoides testiculares.
- La tasa de gestación parece ser superior con el uso de espermatozoides testiculares tras la transferencia de un blastocisto euploide, aunque se requiere de ampliar el tamaño muestral para confirmar una diferencia estadísticamente significativa.
- Específicamente, el cambio a espermatozoides testiculares para la ICSI en sujetos con elevada FAE en el eyaculado y fallos previos de ICSI favorece significativamente las probabilidades de tener un embarazo evolutivo y un bebé en casa, al tiempo que reduce las probabilidades de aborto.

REFERENCIAS

- Abhyankar, N., Kathrins, M., & Niederberger, C. (2016). Use of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with cryptozoospermia: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 105(6), 1469-1475.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.02.013>
- Adamson GD, Zegers-Hochschild F, Dyer S, Chambers G, de Mouzon J, Ishihara O, Kupka M, Banker M, Jwa SC, Elgindy E, Baker V., & International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: World Report on Assisted Reproductive Technology. (2023). *ICMART PRELIMINARY WORLD REPORT 2018*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>;
- Agarwal, A., & Allamaneni, S. S. R. (2005). Sperm DNA damage assessment: A test whose time has come. *Fertility and Sterility*, 84(4), 850–853. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.03.080>
- Agarwal, A., Barbăroșie, C., Ambar, R., & Finelli, R. (2020). The impact of single-and double-strand dna breaks in human spermatozoa on assisted reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21113882>
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10271, pp. 319–333). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Agarwal, A., Cho, C. L., & Esteves, S. C. (2016). Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 28(3), 164–171. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000271>
- Agarwal, A., Cho, C. L., Majzoub, A., & Esteves, S. C. (2017). The Society for Translational Medicine: Clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility. *Translational Andrology and Urology*, 6(Suppl 4), S720–S733. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.08.06>
- Agarwal, A., Gupta, S., Du Plessis, S., Sharma, R., Esteves, S. C., Cirenza, C., Eliwa, J., Al-Najjar, W., Kumaresan, D., Haroun, N., Philby, S., & Sabanegh, E. (2016). Abstinence Time and Its Impact on Basic and Advanced Semen Parameters. *Urology*, 94, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.03.059>

- Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Selvam, M. K. P., Cho, C. L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosie, C., Parekh, N., Alves, M. G., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., ... Shah, R. (2020). Sperm DNA fragmentation: A new guideline for clinicians. In *World Journal of Men's Health* (Vol. 38). Korean Society for Sexual Medicine and Andrology. <https://doi.org/10.5534/WJMH.200128>
- Agarwal, A., Majzoub, A., Esteves, S. C., Ko, E., Ramasamy, R., & Zini, A. (2016). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: Practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, 5(6), 935–950. <https://doi.org/10.21037/tau.2016.10.03>
- Agarwal, A., Prabakaran, S., & Allamaneni, S. (2006). What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. In *Urology* (Vol. 67, Issue 1, pp. 2–8). <https://doi.org/10.1016/j.urology.2005.07.012>
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & du Plessis, S. S. (2014). Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1), 1. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
- Aitken, R. J., Bronson, R., Smith, T. B., & De Iuliis, G. N. (2013). The source and significance of dna damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Molecular Human Reproduction*, 19(8), 475–485. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat025>
- Alahmar, A. T., Sengupta, P., Dutta, S., & Calogero, A. E. (2021). Coenzyme Q10, oxidative stress markers, and sperm DNA damage in men with idiopathic oligoasthenoteratospermia. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 48(2), 150–155. <https://doi.org/10.5653/cerm.2020.04084>
- Alharbi, M., Almarzouq, A., & Zini, A. (2020). Sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection outcomes with testicular sperm aspiration in men with severe oligozoospermia and cryptozoospermia. *Canadian Urological Association Journal*, 15(5). <https://doi.org/10.5489/CUAJ.6798>
- Alharbi, M., Hamouche, F., Phillips, S., Kadoch, J. I., & Zini, A. (2019). Use of testicular sperm in couples with SCSA- defined high sperm DNA fragmentation and failed

- intracytoplasmic sperm injection using ejaculated sperm. *Asian Journal of Andrology*, 21(July), 1–6. <https://doi.org/10.4103/aja.aja>
- Al-Malki, A. H., Alrabeeah, K., Mondou, E., Brochu-Lafontaine, V., Phillips, S., & Zini, A. (2017). Testicular sperm aspiration (TESA) for infertile couples with severe or complete asthenozoospermia. *Andrology*, 5(2), 226–231. <https://doi.org/10.1111/andr.12317>
- Amaral, A., Castillo, J., Ramalho-Santos, J., & Oliva, R. (2014). The combined human sperm proteome: Cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Human Reproduction Update*, 20(1), 40–62. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt046>
- Amdani, S. N., Yeste, M., Jones, C., & Coward, K. (2015). Sperm factors and oocyte activation: Current controversies and considerations. *Biology of Reproduction*, 93(2), 1–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.130609>
- Antonouli, S., Papatheodorou, A., Panagiotidis, Y., Petousis, S., Prapas, N., Nottola, S. A., Palmerini, M. G., Macchiarelli, G., & Prapas, Y. (2019). The impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome in cases of donated oocytes. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 300(1), 207–215. <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05133-9>
- Arafa, M., AlMalki, A., AlBadr, M., Burjaq, H., Majzoub, A., AlSaid, S., & Elbardisi, H. (2018). ICSI outcome in patients with high DNA fragmentation: Testicular versus ejaculated spermatozoa. *Andrologia*, 50(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/and.12835>
- Asebiri. (2015). Cuadernos de embriología clínica. *Asociación Para El Estudio de La Biología de La Reproducción*, 3ª Edición.
- Auger, J., Mesban, M., Huber, C., & Dadoune, J. P. (1990). Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *International Journal of Andrology*, 13(6), 452–462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1990.tb01052.x>
- Avalos-Durán, G., Ángel, A. M. E. C. Del, Rivero-Murillo, J., Zambrano-Guerrero, J. E., Carballo-Mondragón, E., & Checa-Vizcaíno, M. Á. (2018). Physiological ICSI (PICSI) vs. conventional ICSI in couples with male factor: A systematic review.

- Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*, 22(2), 139–147.
<https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180027>
- Avendaño, C., Franchi, A., Duran, H., & Oehninger, S. (2010). DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility and Sterility*, 94(2), 549–557.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.050>
- Awaga, H. A., Bosdou, J. K., Goulis, D. G., Chatzimeletiou, K., Salem, M., Roshdy, S., Grimbizis, G., Tarlatzis, B. C., & Kolibianakis, E. M. (2018). Testicular versus ejaculated spermatozoa for ICSI in patients without azoospermia: A systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(5), 573–580.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.08.017>
- Bartosovic, M., Kabbe, M., & Castelo-Branco, G. (2021). Single-cell CUT&Tag profiles histone modifications and transcription factors in complex tissues. *Nature Biotechnology*, 39(7), 825–835. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00869-9>
- Baskaran, S., Finelli, R., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. In *Andrologia* (Vol. 53, Issue 2). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/and.13614>
- Ben-Ami, I., Raziel, A., Strassburger, D., Komarovsky, D., Ron-El, R., & Friedler, S. (2013). Intracytoplasmic sperm injection outcome of ejaculated versus extracted testicular spermatozoa in cryptozoospermic men. *Fertility and Sterility*, 99(7), 1867–1871. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.025>
- Bernardini, L., Gianaroli, L., Fortini, D., Conte, N., Magli, C., Cavani, S., Gaggero, G., Tindiglia, C., Ragni, N., & Venturini, P. L. (2000). Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Human Reproduction*, 15(10), 2165–2172.
<https://doi.org/10.1093/humrep/15.10.2165>
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., & Wright, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, 508(7497), 483–487.
<https://doi.org/10.1038/nature13203>
- Borges, E., Zanetti, B. F., Setti, A. S., Braga, D. P. de A. F., Provenza, R. R., & Iaconelli, A. (2019). Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development,

- lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 112(3), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.029>
- Bradley, C. K., McArthur, S. J., Gee, A. J., Weiss, K. A., Schmidt, U., & Toogood, L. (2016). Intervention improves assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm DNA fragmentation: a retrospective analysis. *Andrology*, 4(5), 903–910. <https://doi.org/10.1111/andr.12215>
- Bromfield, J. J., Schjenken, J. E., Chin, P. Y., Care, A. S., Jasper, M. J., & Robertson, S. A. (2014). Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2200–2205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305609111>
- Bungum, M., Bungum, L., Lynch, K. F., Wedlund, L., Humaidan, P., & Giwercman, A. (2012). Spermatozoa DNA damage measured by sperm chromatin structure assay (SCSA) and birth characteristics in children conceived by IVF and ICSI. *International Journal of Andrology*, 35(4), 485–490. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01222.x>
- Casanovas, A., Ribas-Maynou, J., Lara-Cerrillo, S., Jimenez-Macedo, A. R., Hortal, O., Benet, J., Carrera, J., & García-Peiró, A. (2019). Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertility and Sterility*, 111(4), 699–707.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.035>
- Castillo, J., Jodar, M., & Oliva, R. (2018). The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*, 24(5), 535–555. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy017>
- Chen, Q., Zhao, J. Y., Xue, X., & Zhu, G. X. (2019). The association between sperm DNA fragmentation and reproductive outcomes following intrauterine insemination, a meta analysis. In *Reproductive Toxicology* (Vol. 86, pp. 50–55). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.03.004>

- Cheung S., Schlegel PN., Rosenwaks Z., & Palermo GP. (2019). Revisiting aneuploidy profile of surgically retrieved spermatozoa by whole exome sequencing molecular karyotype. *PLOS One*.
- Chohan, K. R., Griffin, J. T., Lafromboise, M., De Jonge, C. J., & Carrell, D. T. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology*, 27(1), 53–59. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05068>
- Cissen, M., Van Wely, M., Scholten, I., Mansell, S., De Bruin, J. P., Mol, B. W., Braat, D., Repping, S., & Hamer, G. (2016). Measuring sperm DNA fragmentation and clinical outcomes of medically assisted reproduction: A systematic review and meta analysis. *PLoS ONE*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165125>
- Collins, J. A., Barnhart, K. T., & Schlegel, P. N. (2008). Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertility and Sterility*, 89(4), 823–831. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.04.055>
- de Castro, P., Vendrell, X., Escrich, L., Grau, N., Gonzalez-Martin, R., Quiñonero, A., Dominguez, F., & Escribá, M. J. (2023). Comparative single-cell transcriptomic profiles of human androgenotes and parthenogenotes during early development. *Fertility and Sterility*, 119(4), 675–687. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.12.027>
- Dearing, C., Jayasena, C., & Lindsay, K. (2021). Can the Sperm Class Analyser (SCA) CASA-Mot system for human sperm motility analysis reduce imprecision and operator subjectivity and improve semen analysis? *Human Fertility*, 24(3), 208–218. <https://doi.org/10.1080/14647273.2019.1610581>
- Del Gallego, R., Remohí, J., & Meseguer, M. (2019). Time-Lapse Imaging : The State of the Art . *Biology of Reproduction*, pii: ioz035.
- Derouchey, J., Hoover, B., & Rau, D. C. (2013). A comparison of DNA compaction by arginine and lysine peptides: A physical basis for arginine rich protamines. *Biochemistry*, 52(17), 3000–3009. <https://doi.org/10.1021/bi4001408>
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. In *Advances in Urology*. <https://doi.org/10.1155/2012/854837>

- Dutta, S., Henkel, R., & Agarwal, A. (2020). Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation. *Andrologia*, May, 1–18. <https://doi.org/10.1111/and.13718>
- Egea, R. R., Puchalt, N. G., Escrivá, M. M., & Varghese, A. C. (2014). OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 7(2), 73–92. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.138857>
- Eliveld, J., van Wely, M., Meicßner, A., Repping, S., van der Veen, F., & van Pelt, A. M. (2018). The risk of TESE-induced hypogonadism: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 24(4), 442–454. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy015>
- Esbert, M., Godo, A., Soares, S. R., Florensa, M., Amorós, D., Ballesteros, A., & Vidal, F. (2017). Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are more prone to be retained by Annexin V-MACS columns. *Andrology*, 5(4), 807–813. <https://doi.org/10.1111/andr.12376>
- Esbert, M., Pacheco, A., Soares, S. R., Amorós, D., Florensa, M., Ballesteros, A., & Meseguer, M. (2018). High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics when oocytes from young and healthy donors are microinjected. *Andrology*, 6(5), 697–706. <https://doi.org/10.1111/andr.12551>
- Esbert, M., Pacheco, A., Vidal, F., Florensa, M., Riqueros, M., Ballesteros, A., Garrido, N., & Calderón, G. (2011). Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(6), 704–710. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.07.010>
- Esteves, S. C., Agarwal, A., & Majzoub, A. (2017). Sperm DNA fragmentation test results reflect the overall quality of the whole semen specimen. In *Translational Andrology and Urology* (Vol. 6, pp. S592–S593). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.03.15>
- Esteves, S. C., Coimbra, I., & Hallak, J. (2023). Surgically retrieved spermatozoa for ICSI cycles in non-azoospermic males with high sperm DNA fragmentation in semen. In *Andrology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/andr.13405>

- Esteves, S. C., Miyaoka, R., & Agarwal, A. (2011). Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *International Braz J Urol*, 37(5), 570–583. <https://doi.org/10.1590/S1677-55382011000500002>
- Esteves, S. C., Roque, M., Bradley, C. K., & Garrido, N. (2017). Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 108(3), 456–467.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.018>
- Esteves, S. C., Sánchez-Martín, F., Sánchez-Martín, P., Schneider, D. T., & Gosálvez, J. (2015). Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Fertility and Sterility*, 104(6), 1398–1405. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.028>
- Esteves, S. C., Sharma, R. K., Gosálvez, J., & Agarwal, A. (2014). A translational medicine appraisal of specialized andrology testing in unexplained male infertility. *International Urology and Nephrology*, 46(6), 1037–1052. <https://doi.org/10.1007/s11255-014-0715-0>
- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., Sharma, R., & Humaidan, P. (2020). Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, June, 1–41. <https://doi.org/10.1111/and.13874>
- Esteves, S., Roque, M., & Garrido, N. (2018). Use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with high sperm DNA fragmentation: A SWOT analysis. In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 20, Issue 1, pp. 1–8). Wolters Kluwer Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/aja.aja_7_17
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65(5 SPEC. ISS.), 979–991. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.011>
- Feijó, C. M., & Esteves, S. C. (2014). Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained

infertility. *Fertility and Sterility*, 101(1).
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.002>

Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, 24(1), 59–66.
<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x>

Ferreira Aderaldo, J., da Silva Maranhão, K., & Ferreira Lanza, D. C. (2023). Does microfluidic sperm selection improve clinical pregnancy and miscarriage outcomes in assisted reproductive treatments? A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 18(11), e0292891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292891>

Figueira R CJ, Bento FC, Melo AA, Martinhago CD, & Esteves SC. (2019). *ICSI using surgically retrieved testicular sperm of non-azoospermic men with high sperm DNA fragmentation index and blastocyst ploidy: a safe approach human reproduction Abstracts of the 35th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology*. www.humrep.oxfordjournals.

Filimberti, E., Degl’Innocenti, S., Borsotti, M., Quercioli, M., Piomboni, P., Natali, I., Fino, M. G., Caglieresi, C., Criscuoli, L., Gandini, L., Biggeri, A., Maggi, M., & Baldi, E. (2013). High variability in results of semen analysis in andrology laboratories in Tuscany (Italy): the experience of an external quality control (EQC) programme. *Andrology*, 1(3), 401–407. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2012.00042.x>

García-Herrero, S., Garrido, N., Martínez-Conejero, J. A., Remohí, J., Pellicer, A., & Meseguer, M. (2011). Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reproductive BioMedicine Online*, 22(1), 25–36.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.09.013>

García-Mengual, E., Triviño, J. C., Sáez-Cuevas, A., Bataller, J., Ruíz-Jorro, M., & Vendrell, X. (2019). Male infertility: establishing sperm aneuploidy thresholds in the laboratory. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (Vol. 36, Issue 3, pp. 371–381). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1385-0>

- Garrido, N., García-Herrero, S., & Meseguer, M. (2013). Assessment of sperm using mRNA microarray technology. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1008–1022. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.006>
- Garrido, N., Remohi, J., Martínez-Conejero, J. A., García-Herrero, S., Pellicer, A., & Meseguer, M. (2008). Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(6), 855–865. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60415-4](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60415-4)
- Gawecka, J. E., Ribas-Maynou, J., Benet, J., & Ward, W. S. (2015). A model for the control of DNA integrity by the sperm nuclear matrix. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 610–615. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153853>
- Gianaroli, L., Magli, M. C., Cavallini, G., Crippa, A., Nadalini, M., Bernardini, L., Menchini Fabris, G. F., Voliani, S., & Ferraretti, A. P. (2005). Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Human Reproduction*, 20(8), 2140–2152. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei033>
- Gil Juliá, M., Hervás, I., Navarro-Gomezlechón, A., Quintana, F., Amorós, D., Pacheco, A., González-Ravina, C., Rivera-Egea, R., & Garrido, N. (2022). Cumulative live birth rates in donor oocyte ICSI cycles are not improved by magnetic-activated cell sorting sperm selection. *Reproductive BioMedicine Online*, 44(4), 677–684. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.09.024>
- Gilman, A. R., Younes, G., Tannus, S., Son, W. Y., Chan, P., & Buckett, W. (2018). Does using testicular sperm retrieval rather than ejaculated spermatozoa improve reproductive outcomes in couples with previous ART failure and poor ovarian response? A case-controlled study. *Andrology*, 6(1), 142–145. <https://doi.org/10.1111/andr.12447>
- Gold, H. B., Jung, Y. H., & Corces, V. G. (2018). Not just heads and tails: The complexity of the sperm epigenome. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 293, Issue 36, pp. 13815–13820). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.001561>
- González-Marín, C., Gosálvez, J., & Roy, R. (2012). Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. In *International Journal*

- of Molecular Sciences* (Vol. 13, Issue 11, pp. 14026–14052). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms131114026>
- Gouhier, C., Pons-Rejraji, H., Dollet, S., Chaput, L., Bourgne, C., Berger, M., Pereira, B., Tchirkov, A., & Brugnon, F. (2023). Freezing Does Not Alter Sperm Telomere Length despite Increasing DNA Oxidation and Fragmentation. *Genes*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/genes14051039>
- Greco, E., Romano, S., Iacobelli, M., Ferrero, S., Baroni, E., Minasi, M. G., Ubaldi, F., Rienzi, L., & Tesarik, J. (2005). ICSI in cases of sperm DNA damage: Beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reproduction*, 20(9), 2590–2594. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei091>
- Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., Franco, G., Anniballo, N., Mendoza, C., & Tesarik, J. (2005). Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human Reproduction*, 20(1), 226–230. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh590>
- Green, K. A., Patounakis, G., Dougherty, M. P., Werner, M. D., Scott, R. T., & Franasiak, J. M. (2020). Sperm DNA fragmentation on the day of fertilization is not associated with embryologic or clinical outcomes after IVF/ICSI. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(1), 71–76. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01632-5>
- Güneş, S., & Kulaç, T. (2013). The role of epigenetics in spermatogenesis. In *Turkish Journal of Urology* (Vol. 39, Issue 3, pp. 181–187). <https://doi.org/10.5152/tud.2013.037>
- Hachem, A., Godwin, J., Ruas, M., Lee, H. C., Buitrago, M. F., Ardestani, G., Bassett, A., Fox, S., Navarrete, F., De Sutter, P., Heindryckx, B., Fissore, R., & Parrington, J. (2017). Plc ζ is the physiological trigger of the Ca²⁺ oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence. *Development (Cambridge)*, 144(16), 2914–2924. <https://doi.org/10.1242/dev.150227>
- Hamada, A., Esteves, S. C., Nizza, M., & Agarwal, A. (2012). Unexplained male infertility: Diagnosis and management. *International Braz J Urol*, 38(5), 576–594. <https://doi.org/10.1590/S1677-55382012000500002>

- Hammoud, I., Boitrelle, F., Ferfour, F., Vialard, F., Bergere, M., Wainer, B., Bailly, M., Albert, M., & Selva, J. (2013). Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates. *Andrologia*, 45(3), 163–170. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2012.01328.x>
- Hao, S. L., Ni, F. Da, & Yang, W. X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. In *Gene* (Vol. 706, pp. 201–210). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.027>
- Hasanen, E., Elqusi, K., Eltanbouly, S., Hussin, A. E., Alkhadr, H., Zaki, H., Henkel, R., & Agarwal, A. (2020). PICS1 vs. MACS for abnormal sperm DNA fragmentation ICSI cases: a prospective randomized trial. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37, 2065–2613. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01913-4/Published>
- Henkel, R., Sandhu, I. S., & Agarwal, A. (2019). The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility? *Andrologia*, 51(1). <https://doi.org/10.1111/and.13162>
- Herrero, M. B., Lusignan, M. F., Son, W. Y., Sabbah, M., Buckett, W., & Chan, P. (2019). ICSI outcomes using testicular spermatozoa in non-azoospermic couples with recurrent ICSI failure and no previous live births. *Andrology*, 7(3), 281–287. <https://doi.org/10.1111/andr.12591>
- Hervás, I., Pacheco, A., Gil Julia, M., Rivera-Egea, R., Navarro-Gomezlechón, A., & Garrido, N. (2022). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation (by terminal deoxynucleotidyl transferase biotin dUTP nick end labeling assay) does not impair reproductive success measured as cumulative live birth rates per donor metaphase II oocyte used. *Fertility and Sterility*, 118(1), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.04.002>
- Hervas, I., Pacheco, A., Rivera-Egea, R., Gil Julia, M., Navarro-Gomezlechón, A., Gil Julia, M., Navarro-Gomezlechón, A., & Garrido, N. (2022). IVF/ICSI cumulative live birth rates per consumed oocyte remain comparable regardless of sperm DNA fragmentation by TUNEL. *Reproductive BioMedicine Online*, 44(6), 1079–1089. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.02.010>

- Hirohashi, N., & Yanagimachi, R. (2018). *Sperm acrosome reaction: Its site and role in fertilization*. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy045/4867964>
- Horta, F., Catt, S., Ramachandran, P., Vollenhoven, B., & Temple-Smith, P. (2020). Female ageing affects the DNA repair capacity of oocytes in IVF using a controlled model of sperm DNA damage in mice. *Human Reproduction*, 35(3), 529–544. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez308>
- Hourvitz, A., Shulman, A., Madjar, I., Levron, J., Levran, D., Mashiach, S., & Dor, J. (1998). In vitro fertilization treatment for severe male factor: A comparative study of intracytoplasmic sperm injection with testicular sperm extraction and with spermatozoa from ejaculate. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 15(6), 386–389. <https://doi.org/10.1023/A:1022537117578>
- Hozain M., Alkhader H., Eltanbouly S., & Zaki H. (2018). A comparison of reproductive outcome using testicular sperm Vs. ejaculated sperm in ICSI for patients with abnormal DNA fragmentation. In *Abstracts of the 34th Annual Meeting of ESHRE*.
- Hozyen, M., Hasanen, E., Elqusi, K., Eltanbouly, S., Gamal, S., Hussin, A. G., Alkhader, H., & Zaki, H. (2020). Reproductive Outcomes of Different Sperm Selection Techniques for ICSI Patients with Abnormal Sperm DNA Fragmentation: a Randomized Controlled Trial. *Reproductive Sciences*, 29, 220–228. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00642-y/Published>
- Ibrahim, L. A., Rizo, J. A., Fontes, P. L. P., Lamb, G. C., & Bromfield, J. J. (2019). Seminal plasma modulates expression of endometrial inflammatory mediators in the bovine. *Biology of Reproduction*, 100(3), 660–671. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy226>
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, & Okabe M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, 434(7030), 229–234. <https://doi.org/10.1038/nature03318>
- Jaiswal, A., Baliu-Souza, T., Turner, K., Nadiminty, N., Rambhatla, A., Agarwal, A., Krawetz, S. A., Dupree, J. M., Saltzman, B., Schon, S. B., & Avidor-Reiss, T. (2022). Sperm centriole assessment identifies male factor infertility in couples with unexplained infertility – a pilot study. *European Journal of Cell Biology*, 101(3). <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2022.151243>

- Jayaraman, V., Upadhyay, D., Narayan, P. K., & Adiga, S. K. (2012). Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(6), 557–563. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9742-x>
- Kang, Y. N., Hsiao, Y. W., Chen, C. Y., & Wu, C. C. (2018). Testicular sperm is superior to ejaculated sperm for ICSI in cryptozoospermia: An update systematic review and meta-analysis. In *Scientific Reports* (Vol. 8, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26280-0>
- Kashir, J., Jones, C., Lee, H. C., Rietdorf, K., Nikiforaki, D., Durrans, C., Ruas, M., Tee, S. T., Heindryckx, B., Galione, A., De Sutter, P., Fissore, R. A., Parrington, J., & Coward, K. (2011). Loss of activity mutations in phospholipase C zeta (PLC ζ) abolishes calcium oscillatory ability of human recombinant protein in mouse oocytes. *Human Reproduction*, 26(12), 3372–3387. <https://doi.org/10.1093/humrep/der336>
- Kashir, J., Nomikos, M., & Lai, F. A. (2018). Phospholipase C zeta and calcium oscillations at fertilisation: The evidence, applications, and further questions. In *Advances in Biological Regulation* (Vol. 67, pp. 148–162). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.10.012>
- Kendall Rauchfuss, L. M., Kim, T., Bleess, J. L., Ziegelmann, M. J., & Shenoy, C. C. (2021). Testicular sperm extraction vs. ejaculated sperm use for nonazoospermic male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 116(4), 963–970. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.05.087>
- Kocur, O. M., Xie, P., Cheung, S., Souness, S., McKnight, M., Rosenwaks, Z., & Palermo, G. D. (2023). Can a sperm selection technique improve embryo ploidy? *Andrology*, 11(8), 1605–1612. <https://doi.org/10.1111/andr.13362>
- Ku, F. Y., Wu, C. C., Hsiao, Y. W., & Kang, Y. N. (2018). Association of sperm source with miscarriage and take-home baby after ICSI in cryptozoospermia: a meta-analysis of testicular and ejaculated sperm. *Andrology*, 6(6), 882–889. <https://doi.org/10.1111/andr.12546>
- Kuchakulla, M., Masterson, T., Arora, H., Kulandavelu, S., & Ramasamy, R. (2018). Effect of nitroso-redox imbalance on male reproduction. In *Translational Andrology*

- and Urology* (Vol. 7, Issue 6, pp. 968–977). AME Publishing Company.
<https://doi.org/10.21037/tau.2018.08.14>
- Kuchakulla, M., Narasimman, M., Khodamoradi, K., Khosravizadeh, Z., & Ramasamy, R. (2021). How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity. In *Andrologia* (Vol. 53, Issue 1). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/and.13615>
- Lara-Cerrillo, S., Ribas-Maynou, J., Rosado-Iglesias, C., Lacruz-Ruiz, T., Benet, J., & García-Peiró, A. (2021). Sperm selection during ICSI treatments reduces single- but not double-strand DNA break values compared to the semen sample. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(5), 1187–1196.
<https://doi.org/10.1007/s10815-021-02129-w>
- Lara-Cerrillo, S., Urda Muñoz, C., de la Casa Heras, M., Camacho Fernández-Pacheco, S., Gijón de la Santa, J., Lacruz-Ruiz, T., Rosado-Iglesias, C., Gonçalves-Aponte, V., Badajoz Liébana, V., & García-Peiró, A. (2023). Microfluidic sperm sorting improves ICSI outcomes in patients with increased values of Double-Strand Breaks in sperm DNA. *Revista Internacional de Andrologia*, 21(1).
<https://doi.org/10.1016/j.androl.2021.10.003>
- Lee, J. A., Kuchakulla, M., Arora, H., Kulandavelu, S., Gonzalez, E., Masterson, T. A., Hare, J. M., Kaiser, U. B., & Ramasamy, R. (2019). Age induced nitroso-redox imbalance leads to subclinical hypogonadism in Male mice. *Frontiers in Endocrinology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00190>
- Lee, S. H., Park, C. W., Cheon, Y. P., & Lim, C. K. (2018). Potential of testicular sperm to support embryonic development to the blastocyst stage is comparable to that of ejaculated sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(6), 1103–1111. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1191-8>
- Levron, J., Aviram-Goldring, A., Madgar, I., Raviv, G., Barkai, G., & Dor, J. (2001). *Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection*.
- Lewis, S. E. M., Aitken, R. J., Conner, S. J., De Iuliis, G., Evenson, D. P., Henkel, R., Giwercman, G. A., & Gharagozloo, P. (2013). The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: Recent advances in diagnosis and treatment.

- Li, W., Wu, J., Kim, S. Y., Zhao, M., Hearn, S. A., Zhang, M. Q., Meistrich, M. L., & Mills, A. A. (2014). Chd5 orchestrates chromatin remodelling during sperm development. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4812>
- Li, Z., Wang, L., Cai, J., & Huang, H. (2006). Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 23(9–10), 367–376. <https://doi.org/10.1007/s10815-006-9066-9>
- Llavanera, M., Delgado-Bermúdez, A., Ribas-Maynou, J., Salas-Huetos, A., & Yeste, M. (2022). A systematic review identifying fertility biomarkers in semen: a clinical approach through Omics to diagnose male infertility. In *Fertility and Sterility* (Vol. 118, Issue 2, pp. 291–313). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.04.028>
- Majzoub, A., Agarwal, A., & Esteves, S. C. (2017). Antioxidants for elevated sperm DNA fragmentation: A mini review. In *Translational Andrology and Urology* (Vol. 6, pp. S649–S653). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.07.09>
- Majzoub, A., Esteves, S. C., Gosálvez, J., & Agarwal, A. (2016). Specialized sperm function tests in varicocele and the future of andrology laboratory. *Asian Journal of Andrology*, 18(2), 205–212. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.172642>
- Mallidis, C., Cooper, T. G., Hellenkemper, B., Lablans, M., Ückert, F., & Nieschlag, E. (2012). Ten years' experience with an external quality control program for semen analysis. *Fertility and Sterility*, 98(3). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.05.006>
- Mangoli, E., Khalili, M. A., Talebi, A. R., Mehdi Kalantar, S., Montazeri, F., Agharahimi, A., & Woodward, B. J. (2020). Association between early embryo morphokinetics plus transcript levels of sperm apoptotic genes and clinical outcomes in IMSI and ICSI cycles of male factor patients. *REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY AND DISEASE*, 37, 2555–2567. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01910-7/Published>
- Manicardi, G. C., Bianchi, P. G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzar0, D., Bianchi, U., & Sakkas, D. (1995). Presence of Endogenous Nicks in DNA of Ejaculated Human

- Spermatozoa and Its Relationship to Chromomycin A 3 Accessibility'. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 52).
<https://academic.oup.com/biolreprod/article/52/4/864/2761548>
- Marshburn, P. B., Alanis, M., Matthews, M. L., Usadi, R., Papadakis, M. H., Kullstam, S., & Hurst, B. S. (2010). A short period of ejaculatory abstinence before intrauterine insemination is associated with higher pregnancy rates. *Fertility and Sterility*, 93(1), 286–288. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.07.972>
- Martin-Deleon, P. A. (2011). Germ-cell hyaluronidases: Their roles in sperm function. *International Journal of Andrology*, 34(5 PART 2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01138.x>
- Martinez-Soto, J. C., Landeras, J., Mollá, M., Mondejar, I., Nicolás, M., Fernández-Olmedilla, L., Trabalón, M., Coy, P., & Gadea, J. (2018). Total urokinase-type plasminogen activator (uPA) levels in seminal plasma are associated with positive assisted reproductive technology outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(6), 1091–1101. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1164-y>
- Mehta, A., Bolyakov, A., Schlegel, P. N., & Paduch, D. A. (2015). Higher pregnancy rates using testicular sperm in men with severe oligospermia. *Fertility and Sterility*, 104(6), 1382–1387. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.008>
- Mélotie, V. B., & Christine, W. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, March. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., García-Herrero, S., Remohí, J., & Fernandez, J. L. (2011). Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility*, 95(1), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.05.055>
- Mikwar, M., MacFarlane, A. J., & Marchetti, F. (2020). Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 785). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108320>
- Mitchell, L. A., De Iuliis, G. N., & Aitken, R. J. (2011). The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA

- compaction and cell vitality: Development of an improved methodology. *International Journal of Andrology*, 34(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01042.x>
- Moazamian, R., Polhemus, A., Connaughton, H., Fraser, B., Whiting, S., Gharagozloo, P., & Aitken, R. J. (2015). Oxidative stress and human spermatozoa: Diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Molecular Human Reproduction*, 21(6), 502–515. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav014>
- Molina, L. C. P., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A., & Buffone, M. G. (2018). Molecular basis of human sperm capacitation. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00072>
- Moretti, C., Serrentino, M. E., Ialy-Radio, C., Delessard, M., Soboleva, T. A., Tores, F., Leduc, M., Nitschké, P., Drevet, J. R., Tremethick, D. J., Vaiman, D., Kocer, A., & Cocquet, J. (2017). SLY regulates genes involved in chromatin remodeling and interacts with TBL1XR1 during sperm differentiation. *Cell Death and Differentiation*, 24(6), 1029–1044. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.32>
- Mortimer, S. T. (2000). CASA—Practical Aspects. *Journal of Andrology*, 21(4), 515–524. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x>
- Moskovtsev, S. I., Alladin, N., Lo, K. C., Jarvi, K., Mullen, J. B. M., & Librach, C. L. (2012). A comparison of ejaculated and testicular spermatozoa aneuploidy rates in patients with high sperm DNA damage. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(3), 142–148. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.667504>
- Moskovtsev, S. I., Jarvi, K., Mullen, J. B. M., Cadesky, K. I., Hannam, T., & Lo, K. C. (2010). Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1142–1146. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.11.005>
- Muratori, M., Tamburrino, L., Marchiani, S., Cambi, M., Olivito, B., Azzari, C., Forti, G., & Baldi, E. (2015). Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation:

- Role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. *Molecular Medicine*, 21, 109–122. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00158>
- Muratori, M., Tarozzi, N., Carpentiero, F., Danti, S., Perrone, F. M., Cambi, M., Casini, A., Azzari, C., Boni, L., Maggi, M., Borini, A., & Baldi, E. (2019). Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43981-2>
- Muriel, L., Garrido, N., Fernández, J. L., Remohí, J., Pellicer, A., De Los Santos, M. J., & Meseguer, M. (2006). Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 85(2), 371–383. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.07.1327>
- Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Alvarez, J. G., & Fernández, J. L. (2007). Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *Journal of Andrology*, 28(1), 38–49. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000067>
- Nagy, Z., Silber, S., Devroey, P., Liu, J., Cecile, J., Van Steirteghem, A., & Peter Nagy, Z. (1995). Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection*. In *FERTILITY AND STERILITY* (Vol. 63, Issue 4).
- Negri, L., Patrizio, P., Albani, E., Morengi, E., Benaglia, R., Desgro, M., & Levi Setti, P. E. (2014). ICSI outcome is significantly better with testicular spermatozoa in patients with necrozoospermia: A retrospective study. *Gynecological Endocrinology*, 30(1), 48–52. <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.848427>
- Nosrati, R., Graham, P. J., Zhang, B., Riordon, J., Lagunov, A., Hannam, T. G., Escobedo, C., Jarvi, K., & Sinton, D. (2017). Microfluidics for sperm analysis and selection. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 14, Issue 12, pp. 707–730). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.175>
- Nozawa, K., Satouh, Y., Fujimoto, T., Oji, A., & Ikawa, M. (2018). Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19497-6>

- Oguz, Y., Guler, I., Erdem, A., Mutlu, M. F., Gumuslu, S., Oktem, M., Bozkurt, N., & Erdem, M. (2018). The effect of swim-up and gradient sperm preparation techniques on deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation in subfertile patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(6), 1083–1089. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1163-z>
- Oleszczuk, K., Giwercman, A., & Bungum, M. (2016). Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. *Andrology*, 4(2), 290–296. <https://doi.org/10.1111/andr.12153>
- Ombelet, W., Bosmans, E., Janssen, M., Cox, A., Vlasselaer, J., Gyselaers, W., Vandeput, H., Gielen, J., Pollet, H., Maes, M., Steeno, O., Kruger, T., & Jan, S. (1997). Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. In *Human Reproduction vol* (Vol. 12, Issue 5).
- Oron, G., Fisch, B., Sapir, O., Wertheimer, A., Garor, R., Feldberg, D., Pinkas, H., & Ben-Haroush, A. (2014). Pregnancy outcome after ICSI with thawed testicular sperm from men with non-obstructive azoospermia compared to ICSI with ejaculated sperm from men with severe oligoasthenoteratozoospermia and IVF with normal ejaculated sperm. *Gynecological Endocrinology*, 30(2), 103–106. <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.850589>
- Osman, A., Alsomait, H., Seshadri, S., El-Toukhy, T., & Khalaf, Y. (2015). The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(2), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.10.018>
- Pabuccu, E. G., Caglar, G. S., Tangal, S., Haliloglu, A. H., & Pabuccu, R. (2017). Testicular versus ejaculated spermatozoa in ICSI cycles of normozoospermic men with high sperm DNA fragmentation and previous ART failures. *Andrologia*, 49(2), 1–7. <https://doi.org/10.1111/and.12609>
- Pacheco, A., Blanco, A., Bronet, F., Cruz, M., García-Fernández, J., & García-Velasco, J. A. (2020). Magnetic-activated cell sorting (Macs): A useful sperm-selection technique in cases of high levels of sperm dna fragmentation. *Journal of Clinical Medicine*, 9(12), 1–9. <https://doi.org/10.3390/jcm9123976>

- Palermo, G. D., Colombero, L. T., Hariprashad, J. J., Schlegel, P. N., & Rosenwaks, Z. (2002). Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI. In *Human Reproduction* (Vol. 17, Issue 3).
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340(8810), 17–18. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92425-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92425-F)
- Panner Selvam, M. K., Ambar, R. F., Agarwal, A., & Henkel, R. (2020). Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. *Andrologia*, February, 1–15. <https://doi.org/10.1111/and.13706>
- Pardiñas, M. L., Martín, A., Ortega-Jaén, D., De los Santos, J. M., Vilorio, T., Gamiz, P., & De los Santos, M. J. (2022). Sperm DNA fragmentation and microfluidics: A new era in human sperm selection. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 9(3), 100121. <https://doi.org/10.1016/j.medre.2022.100121>
- Parmegiani, L., Cognigni, G. E., 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. *Fertility and Sterility*, 93(2), 598–604. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.033>
- Patel, A. S., Leong, J. Y., & Ramasamy, R. (2018). Prediction of male infertility by the World Health Organization laboratory manual for assessment of semen analysis: A systematic review. In *Arab Journal of Urology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 96–102). Arab Association of Urology. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.10.005>
- Pellestor, F., Andréo, B., Anahory, T., & Hamamah, S. (2006). The occurrence of aneuploidy in human: Lessons from the cytogenetic studies of human oocytes. In *European Journal of Medical Genetics* (Vol. 49, Issue 2, pp. 103–116). <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2005.08.001>
- Pujol, A., García-Peiró, A., Ribas-Maynou, J., Lafuente, R., Mataró, D., & Vassena, R. (2022). A microfluidic sperm-sorting device reduces the proportion of sperm with double-stranded DNA fragmentation. *Zygote*, 30(2), 200–205. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000484>

- Quinn, M. M., Jalalian, L., Ribeiro, S., Ona, K., Demirci, U., Cedars, M. I., & Rosen, M. P. (2018). Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Human Reproduction*, 33(8), 1388–1393. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey239>
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernandez-Encinas, A., Amengual, M. J., Prada, E., Cortés, P., Navarro, J., & Benet, J. (2012). Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044679>
- Ribas-Maynou, J., Yeste, M., Becerra-Tomás, N., Aston, K. I., James, E. R., & Salas-Huetos, A. (2021). Clinical implications of sperm DNA damage in IVF and ICSI: updated systematic review and meta-analysis. *Biological Reviews*, 96(4), 1284–1300. <https://doi.org/10.1111/brv.12700>
- Rivera-Egea, R., Garrido, N., Sota, N., Meseguer, M., Remohí, J., & Dominguez, F. (2018a). Sperm lipidic profiles differ significantly between ejaculates resulting in pregnancy or not following intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(11), 1973–1985. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1284-4>
- Rivera-Egea, R., Garrido, N., Sota, N., Meseguer, M., Remohí, J., & Dominguez, F. (2018b). Sperm lipidic profiles differ significantly between ejaculates resulting in pregnancy or not following intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(11), 1973–1985. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1284-4>
- Robinson, L., Gallos, I. D., Conner, S. J., Rajkhowa, M., Miller, D., Lewis, S., Kirkman-Brown, J., & Coomarasamy, A. (2012). The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 27(10), 2908–2917. <https://doi.org/10.1093/humrep/des261>
- Rodrigo, L., Meseguer, M., Mateu, E., Mercader, A., Peinado, V., Bori, L., Campos-Galindo, I., Milán, M., García-Herrero, S., Simón, C., & Rubio, C. (2019). Sperm

- chromosomal abnormalities and their contribution to human embryo aneuploidy. *Biology of Reproduction*, 101(6), 1091–1101. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz125>
- Rodrigo, L., Rubio, C., Peinado, V., Villamón, R., Al-Asmar, N., Remohí, J., Pellicer, A., Simón, C., & Gil-Salom, M. (2011). Testicular sperm from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia: Aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples. *Fertility and Sterility*, 95(3), 1005–1012. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.10.022>
- Romano, M., Cirillo, F., Spadaro, D., Busnelli, A., Castellano, S., Albani, E., & Levi-Setti, P. E. (2023). High sperm DNA fragmentation: do we have robust evidence to support antioxidants and testicular sperm extraction to improve fertility outcomes? a narrative review. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1150951>
- Roque, M., & Esteves, S. C. (2018). Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a review. In *International Urology and Nephrology* (Vol. 50, Issue 4, pp. 583–603). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11255-018-1839-4>
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.046>
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Nelson, D. R., Nada, E. A., El-Tonsy, M. H., Alvarez, J. G., Thomas, A. J., & Sharma, R. K. (2002). Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: A prospective study. *Fertility and Sterility*, 78(2), 313–318. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03219-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03219-3)
- Sánchez-Martín, P., Dorado-Silva, M., Sánchez-Martín, F., González Martínez, M., Johnston, S. D., & Gosálvez, J. (2017). Magnetic cell sorting of semen containing spermatozoa with high DNA fragmentation in ICSI cycles decreases miscarriage rate. *Reproductive BioMedicine Online*, 34(5), 506–512. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.01.015>
- Sánchez-Martín, P., Sánchez-Martín, F., González-Martínez, M., & Gosálvez, J. (2013). Increased pregnancy after reduced male abstinence. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 59(5), 256–260. <https://doi.org/10.3109/19396368.2013.790919>

- Santi, D., Spaggiari, G., & Simoni, M. (2018). Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.06.023>
- Schisterman, E. F., Sjaarda, L. A., Clemons, T., Carrell, D. T., Perkins, N. J., Johnstone, E., Lamb, D., Chaney, K., Van Voorhis, B. J., Ryan, G., Summers, K., Hotaling, J., Robins, J., Mills, J. L., Mendola, P., Chen, Z., Devilbiss, E. A., Peterson, C. M., & Mumford, S. L. (2020). Effect of Folic Acid and Zinc Supplementation in Men on Semen Quality and Live Birth among Couples Undergoing Infertility Treatment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(1), 35–48. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.18714>
- Sedó, C. A., Bilinski, M., Lorenzi, D., Uriondo, H., Noblía, F., Longobucco, V., Lagar, E. V., & Nodar, F. (2017). Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: Clinical and biological aspects. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*, 21(4), 343–350. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20170061>
- Seli, E., Gardner, D. K., Schoolcraft, W. B., Moffatt, O., & Sakkas, D. (2004). Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 82(2), 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.12.039>
- Setti, A. S., Braga, D. P. A. F., Figueira, R. C. S., Iaconelli, A., & Borges, E. (2014). Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection results in improved clinical outcomes in couples with previous ICSI failures or male factor infertility: A meta-analysis. In *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* (Vol. 183, pp. 96–103). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.10.008>
- Setti, A. S., Braga, D. P. de A. F., Provenza, R. R., Iaconelli, A., & Borges, E. (2021a). Oocyte ability to repair sperm DNA fragmentation: the impact of maternal age on intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertility and Sterility*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.10.045>
- Setti, A. S., Braga, D. P. de A. F., Provenza, R. R., Iaconelli, A., & Borges, E. (2021b). Oocyte ability to repair sperm DNA fragmentation: the impact of maternal age on

- intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertility and Sterility*, 116(1), 123–129.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.10.045>
- Shamsi, M. B., Imam, S. N., & Dada, R. (2011). Sperm DNA integrity assays: Diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(11), 1073–1085.
<https://doi.org/10.1007/s10815-011-9631-8>
- Sharma, R., Agarwal, A., Rohra, V. K., Assidi, M., Abu-Elmagd, M., & Turki, R. F. (2015). Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. In *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s12958-015-0028-x>
- Sharma, R., Iovine, C., Agarwal, A., & Henkel, R. (2020). TUNEL assay—Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia*, April, 1–20.
<https://doi.org/10.1111/and.13738>
- Shukla, K. K., Mahdi, A. A., & Singh, R. (2012). Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. In *Frontiers in Bioscience - Elite: Vol. 4 E* (Issue 2, pp. 746–754). Bioscience Research Institute. <https://doi.org/10.2741/e415>
- Silber, S. J., Devroey, P., Tournaye, H., & Van Steirteghem, A. C. (1995). Fertilizing capacity of epididymal and testicular sperm using intracytoplasmic sperm injection (Icsi). *Reproduction, Fertility and Development*, 7(2), 281–293.
<https://doi.org/10.1071/RD9950281>
- Simerly, C., Manil-Ségalen, M., Castro, C., Hartnett, C., Kong, D., Verlhac, M. H., Loncarek, J., & Schatten, G. (2018). Separation and Loss of Centrioles From Primordidal Germ Cells To Mature Oocytes In The Mouse. *Scientific Reports*, 8(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31222-x>
- Simon, L., Lutton, D., McManus, J., & Lewis, S. E. M. (2011). Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertility and Sterility*, 95(2), 652–657.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.019>
- Simon, L., Proutski, I., Stevenson, M., Jennings, D., McManus, J., Lutton, D., & Lewis, S. E. M. (2013). Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates

- after IVF. *Reproductive BioMedicine Online*, 26(1), 68–78.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.09.019>
- Simon, L., Zini, A., Dyachenko, A., Ciampi, A., & Carrell, D. (2017). A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 80–90. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.182822>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells'. In *Experimental Cell Research* (Vol. 175).
- Smit, M., Romijn, J. C., Wildhagen, M. F., Veldhoven, J. L. M., Weber, R. F. A., & Dohle, G. R. (2013). Decreased sperm DNA fragmentation after surgical varicocele is associated with increased pregnancy rate. *Journal of Urology*, 189(1 SUPPL). <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.11.024>
- Spanò, M., Bonde, J. P., Hjøllund, H. I., Kolstad, H. A., Cordelli, E., & Leter, G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertility and Sterility*, 73(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00462-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00462-8)
- Steiner, A. Z., Hansen, K. R., Barnhart, K. T., Cedars, M. I., Legro, R. S., Diamond, M. P., Krawetz, S. A., Usadi, R., Baker, V. L., Coward, R. M., Huang, H., Wild, R., Masson, P., Smith, J. F., Santoro, N., Eisenberg, E., & Zhang, H. (2020). The effect of antioxidants on male factor infertility: the Males, Antioxidants, and Infertility (MOXI) randomized clinical trial. *Fertility and Sterility*, 113(3), 552-560.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.11.008>
- Steven Ward, W., Coffey, D. S., & Hopkins, J. (1991). MINIRE VIEW DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 44). <https://academic.oup.com/biolreprod/article/44/4/569/2762885>
- Suganuma, R., Yanagimachi, R., & Meistrich, M. L. (2005). Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Human Reproduction*, 20(11), 3101–3108. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei169>
- Sugihara, A., Van Avermaete, F., Roelant, E., Punjabi, U., & De Neubourg, D. (2020). The role of sperm DNA fragmentation testing in predicting intra-uterine

- insemination outcome: A systematic review and meta-analysis. In *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* (Vol. 244, pp. 8–15). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.10.005>
- Sun, T. C., Zhang, Y., Li, H. T., Liu, X. M., Yi, D. X., Tian, L., & Liu, Y. X. (2018). Sperm DNA fragmentation index, as measured by sperm chromatin dispersion, might not predict assisted reproductive outcome. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 57(4), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.06.003>
- Tamburrino, L., Marchiani, S., Montoya, M., Elia Marino, F., Natali, I., Cambi, M., Forti, G., Baldi, E., & Muratori, M. (2012). Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 14, Issue 1, pp. 24–31). <https://doi.org/10.1038/aja.2011.59>
- Tang, B., Shang, X., Qi, H., Li, J., Ma, B., An, G., & Zhang, Q. (2017). Metabonomic analysis of fatty acids in seminal plasma between healthy and asthenozoospermic men based on gas chromatography mass spectrometry. *Andrologia*, 49(9). <https://doi.org/10.1111/and.12744>
- Teixeira, D. M., Hadyme Miyague, A., Barbosa, M. A. P., Navarro, P. A., Raine-Fenning, N., Nastri, C. O., & Martins, W. P. (2020). Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2020, Issue 2). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010167.pub3>
- Ten, J., Guerrero, J., Linares, Á., Rodríguez-Arnedo, A., Morales, R., Lledó, B., Llácer, J., & Bernabeu, R. (2021). Sperm DNA fragmentation on the day of fertilisation is not associated with assisted reproductive technique outcome independently of gamete quality. *Human Fertility*, 0(0), 1–17. <https://doi.org/10.1080/14647273.2021.1877364>
- Tesarik, J., Greco, E., & Mendoza, C. (2004). Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction*, 19(3), 611–615. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh127>
- The European IVF Monitoring Consortium (EIM), for the E. S. of H. R. and E. (ESHRE), C, W., C, D. G., C, C.-J., MS, K., T, M., J, S., C, B., A, T.-S., IA, R., & V, G. (2022).

- ART in Europe, 2018: results generated from European registries by ESHRE. *Human Reproduction Open*, 1–20. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoac022>
- Vallet-Buisan, M., Mecca, R., Jones, C., Coward, K., & Yeste, M. (2023). Contribution of semen to early embryo development: fertilization and beyond. *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmad006>
- Vendrell, X., Ferrer, M., García-Mengual, E., Muñoz, P., Triviño, J. C., Calatayud, C., Rawe, V. Y., & Ruiz-Jorro, M. (2014). Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(4), 492–502. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.12.001>
- Vozdova, M., Heracek, J., Sobotka, V., & Rubes, J. (2012). Testicular sperm aneuploidy in non-obstructive azoospermic patients. *Human Reproduction*, 27(7), 2233–2239. <https://doi.org/10.1093/humrep/des115>
- Weissman, A., Horowitz, E., Ravhon, A., Nahum, H., Golan, A., & Levran, D. (2008). Pregnancies and live births following ICSI with testicular spermatozoa after repeated implantation failure using ejaculated spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(5), 605–609. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60306-9](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60306-9)
- World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen - 5th Edition. *World Health Organization*, 286. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80429-8_22
- World Health Organization. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Sixth Edition*.
- World Health Organization. (2023). *Infertility prevalence estimates, 1990-2021*.
- Xie, P., Keating, D., Parrella, A., Cheung, S., Rosenwaks, Z., Goldstein, M., & Palermo, G. D. (2020). Sperm Genomic Integrity by TUNEL Varies throughout the Male Genital Tract. *Journal of Urology*, 203(4), 802–808. <https://doi.org/10.1097/ju.0000000000000659>
- Xu, M., & Zhu, B. (2010). Nucleosome assembly and epigenetic inheritance. In *Protein and Cell* (Vol. 1, Issue 9, pp. 820–829). Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0104-0>

- Yagci, A., Murk, W., Stronk, J., & Huszar, G. (2010). Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: An acridine orange fluorescence study. *Journal of Andrology*, 31(6), 566–572. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.008912>
- Yalcinkaya Kalyan, E., Can Celik, S., Okan, O., Akdeniz, G., Karabulut, S., & Caliskan, E. (2019). Does a microfluidic chip for sperm sorting have a positive add-on effect on laboratory and clinical outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles? A sibling oocyte study. *Andrologia*, 51(10). <https://doi.org/10.1111/and.13403>
- Yu, X. W., Liu, Y. H., Zhang, X. Y., & Wang, Q. (2021). Reproductive outcomes of testicular and ejaculated sperm for ICSI in patients with previous ICSI failures: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Men's Health*, 17(4), 44–51. <https://doi.org/10.31083/jomh.2021.044>
- Zhang, J., Xue, H., Qiu, F., Zhong, J., & Su, J. (2019). Testicular spermatozoon is superior to ejaculated spermatozoon for intracytoplasmic sperm injection to achieve pregnancy in infertile males with high sperm DNA damage. *Andrologia*, 51(2), 1–7. <https://doi.org/10.1111/and.13175>
- Zhang, Z., Zhu, L., Jiang, H., Chen, H., Chen, Y., & Dai, Y. (2015). Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(1), 17–26. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0374-1>
- Zhang, Z., Zhu, L. L., Jiang, H. S., Chen, H., Chen, Y., & Dai, Y. T. (2016). Predictors of pregnancy outcome for infertile couples attending IVF and ICSI programmes. *Andrologia*, 48(9), 874–881. <https://doi.org/10.1111/and.12525>
- Zhao, J., Zhang, Q., Wang, Y., & Li, Y. (2014). Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: A systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 102(4), 998-1005.e8. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.033>
- Zhuang, T., Hess, R. A., Kolla, V., Higashi, M., Raabe, T. D., & Brodeur, G. M. (2014). CHD5 is required for spermiogenesis and chromatin condensation. *Mechanisms of Development*, 131(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2013.10.005>

- Zini, A. (2011). Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 57(1–2), 78–85. <https://doi.org/10.3109/19396368.2010.515704>
- Zini, A., Bach, P. V., Al-Malki, A. H., & Schlegel, P. N. (2017). Use of testicular sperm for ICSI in oligozoospermic couples: How far should we go? *Human Reproduction*, 32(1), 7–13. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew276>
- Zini, A., Boman, J. M., Belzile, E., & Ciampi, A. (2008). Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 23(12), 2663–2668. <https://doi.org/10.1093/humrep/den321>
- Zini, A., Finelli, A., Phang, D., & Jarvi, K. (2000). INFLUENCE OF SEMEN PROCESSING TECHNIQUE ON HUMAN SPERM DNA INTEGRITY BASIC SCIENCE. In *UROLOGY* (Vol. 56).

ANEXO

Figura suplementaria 1. Esquema para la evaluación embriones in vitro según los criterios establecidos por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) en el segundo y tercer día del desarrollo embrionario.

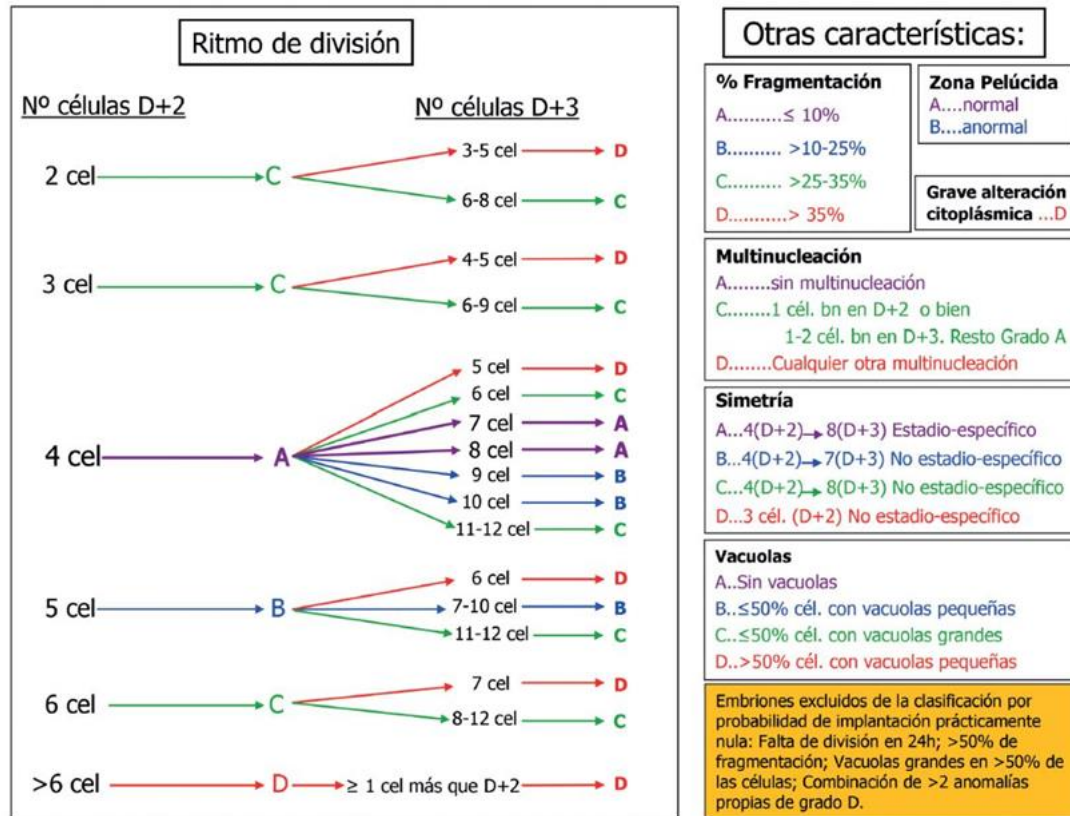


Figura suplementaria 2. Esquema para la evaluación de embriones in vitro según los criterios establecidos por la asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) en el cuarto día del desarrollo embrionario.

D+3	Características morfológicas D+4	D+4
A	Cavitación temprana Compactación total y >8 células	A
	Compactación parcial (1-2 cél. excluidas)	B
	Compactación parcial (>2 cél. excluidas) No compactación (> 8 cél.)	C
B	Cavitación temprana Compactación total y >8 células Compactación parcial (1-2 cél. excluidas)	B
	Compactación parcial (>2 cél. excluidas) No compactación (> 8 cél.)	C
C	Cavitación temprana Compactación total y ≥ 8 células	
	Compactación parcial	D
D	Cualquier característica	

Cualquier embrión que presente en D+4:

- Fragmentación celular >35%.
- Excesiva vacuolización.
- ≤ 8 células sin signos de compactación o compactación < 50% del embrión.

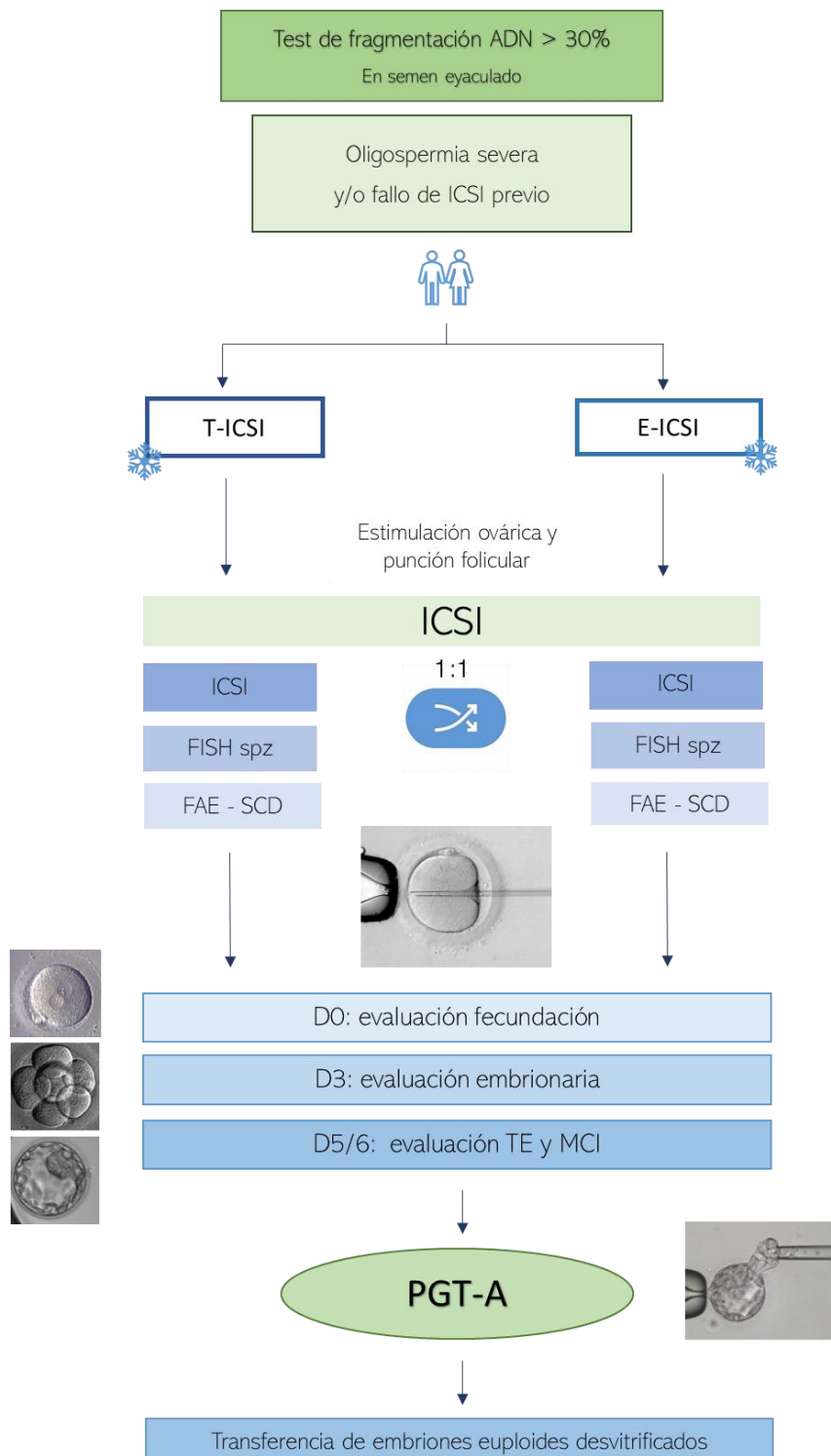
→ **D**

Embriones excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula: Falta de división en 24 horas y embriones que presentan una combinación de >2 características propias de la categoría D.

Figura suplementaria 3. Esquema para la evaluación de embriones in vitro según los criterios establecidos por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) en el quinto día del desarrollo embrionario.

D+4	D+5			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Mórula compacta	Desde: "Iniciando la expansión" Hasta: "Eclosionando"	A	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		B	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		C	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		D	A,B,C o D	D
	Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)			C
Mórula no compacta	Mórula			D

Figura suplementaria 4. Esquema del procedimiento de reclutamiento y planificación del ciclo de ICSI en el cual se microinyectaron los ovocitos de manera aleatorizada con espermatozoides testiculares (T-ICSI) y con espermatozoides del eyaculado (E-ICSI).



Nota: ADN: ácido desoxirribonucleico; ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides, FISH: Fluorescence in situ Hybridization; FAE: fragmentación del ADN espermático; SCD: sperm chromatin dispersion test; PGT-A: diagnóstico genético preimplantación de aneuploidías.

