

**ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN EN EL ADN
ESPERMÁTICO EN PACIENTES SOMETIDOS A TÉCNICAS DE
REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

Tesis doctoral

MARGARIDA ESBERT ALGAM



Departamento de "Biología Cel·lular, Fisiologia i Immunologia"

Facultad de Biociencias. Universidad Aut3noma de Barcelona

Barcelona, 2014

**ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO EN
PACIENTES SOMETIDOS A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

Margarida Esbert Algam

Memoria presentada para la obtención de grado en Doctora en Biología
Celular por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Bellaterra, 2014

Directores:

Dra. Francesca Vidal Domínguez y Dra. Gloria Calderón de Oya

La **Dra. Francesca Vidal Domínguez** del Departamento de “Biología Celular, Fisiología i Immunología” de la Universitat Autònoma de Barcelona, y la **Dra. Gloria Calderón de Oya** de “Embryotools S.L”

CERTIFICAN:

Que Margarida Esbert Algam ha realizado bajo su dirección, en el laboratorio de Fecundación in Vitro de IVI-Barcelona, el trabajo de Tesis Doctoral titulado:

“Estudio de la fragmentación en el ADN espermático en pacientes sometidos a Técnicas de Reproducción Asistida”

Y para que conste, firman el siguiente certificado.

Bellaterra, Noviembre 2014

Dra. Francesca Vidal

Dra. Gloria Calderón

Margarida Esbert

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	LA CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE	3
1.2	MECANISMOS QUE INDUCEN LA FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO:	7
1.2.1	Apoptosis:	7
1.2.2	Empaquetamiento anormal de la cromatina:	11
1.2.3	Radicales libres de oxígeno:	12
1.3	CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN DEL ESPERMATOZOIDE:	16
1.3.1	Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)	16
1.3.2	Tdt-mediated-dUTPNick-End Labelling (TUNEL)	17
1.3.3	Ensayo del COMETA:	18
1.3.4	Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD)	20
1.4	FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y ESTERILIDAD	21
1.5	MÉTODOS PARA DISMINUIR LA FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO	23
1.5.1	Tratamientos antioxidantes:	23
1.5.2	MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)	24
1.5.3	Reducción del periodo de abstinencia:	25
1.5.4	Procesado de la muestra espermática:	26
2	OBJETIVOS	25
3	MATERIAL Y MÉTODOS	33
3.1	ÁMBITO DEL ESTUDIO	35
3.2	GRUPOS DE ESTUDIO	35
3.2.1	Procesado del semen y fragmentación del ADN espermático:	35
3.2.2	Fragmentación del ADN y resultados clínicos de ciclos de FIV:	35
3.2.3	Relación entre la fragmentación en el ADN espermático y los resultados del estudio meiótico y de anomalías cromosómicas de de espermatozoides:	36
3.2.4	Procesado mediante columnas MACS®	37
3.2.5	Fragmentación en el ADN espermático tras columnas MACS® y acortando la abstinencia sexual:	37

3.1	PROCESADO DE LAS MUESTRAS SEMINALES MEDIANTE GRADIENTES DE DENSIDAD.....	37
3.2	CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO	38
3.3	PROCEDIMIENTOS EN EL LABORATORIO DE FIV.....	39
3.4	FISH EN ESPERMATOZOIDES	40
3.5	MEIOSIS EN BIOPSIA TESTICULAR	41
3.6	MACS®	41
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
	3.7.1 Procesado del semen y fragmentación del ADN espermático:	42
	3.7.2 Fragmentación del ADN y resultados clínicos de ciclos de FIV:	42
	3.7.3 Relación entre la fragmentación en el ADN espermático y el análisis meiótico en tejido testicular y en el eyaculado	43
	3.7.4 Procesado mediante columnas MACS	43
	3.7.5 Fragmentación en el ADN espermático tras columnas MACS y acortando la abstinencia sexual.....	43
4	RESULTADOS.....	45
4.1	PROCESADO DEL SEMEN Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO.....	47
4.2	FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO Y RESULTADOS CLÍNICOS DE CICLOS DE FIV.....	49
4.3	RELACION ENTRE LA FRAGMENTACION EN EL ADN ESPERMÁTICO, EL ANÁLISIS MEIÓTICO EN TEJIDO TESTICULAR Y LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOZOIDES.	53
4.4	PROCESADO MEDIANTE COLUMNAS MACS®.....	58
4.5	FRAGMENTACION EN EL ADN ESPERMÁTICO TRAS COLUMNAS MACS® Y ACORTANDO LA ABSTINENCIA SEXUAL	60
5	DISCUSIÓN	63
5.1	PROCESADO DEL SEMEN Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO.....	65
5.2	FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO Y RESULTADOS CLÍNICOS DE CICLOS DE FIV.....	67
5.3	FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO, ANÁLISIS MEIÓTICO EN TEJIDO TESTICULAR Y DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOZOIDES.....	70
5.4	PROCESADO DEL SEMEN MEDIANTE MACS®.....	73
5.5	COLUMNAS MACS Y ACORTAMIENTO DE LA ABSTINENCIA SEXUAL COMO HERRAMIENTAS PARA DISMINUIR LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO:.....	75
6	CONCLUSIONES.....	79
7	BIBLIOGRAFÍA	83
8	GLOSARIO.....	99
9	AGRADECIMIENTOS	103

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE

La organización de la cromatina del espermatozoide difiere mucho de la que se observa en las células somáticas (Figura I-1). Las principales características de la cromatina espermática son: el alto grado de compactación (6 veces más que una célula somática), el poco volumen que ocupa (40 veces menos que una célula somática) y su gran estabilidad.

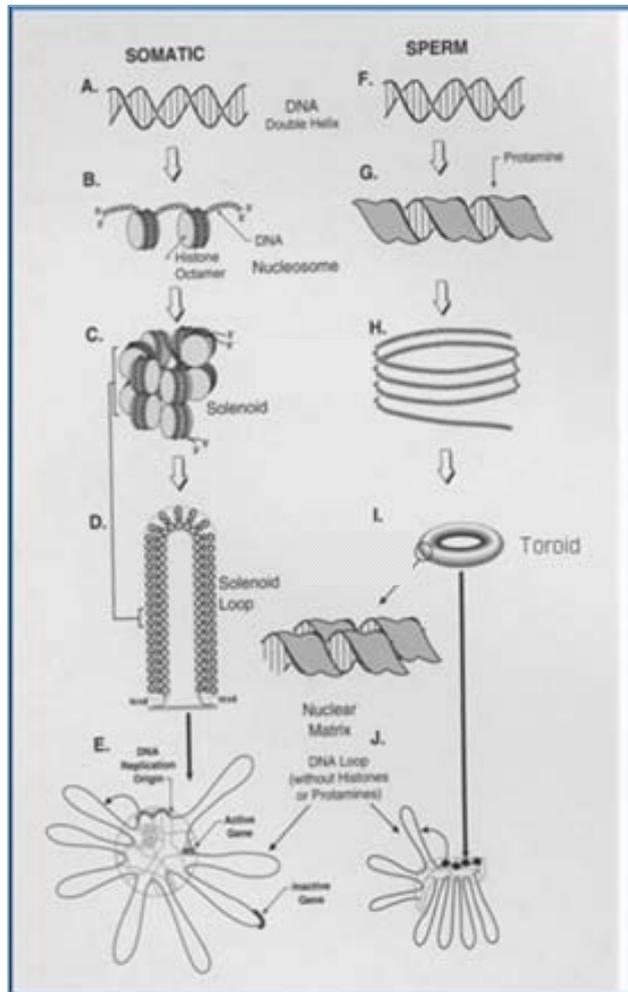


Figura I-1. Esquema comparativo entre la estructura de la cromatina de células somáticas y la de espermatozoides (Ward and Coffey, 1991)

Se ha considerado que el principal objetivo que persigue la distinta organización del ADN espermático, es minimizar el posible daño de agentes exógenos durante su tránsito por el tracto genital femenino y mantener el genoma transcripcionalmente inactivo. No obstante, estudios recientes sugieren que la compleja estructura que presenta la cromatina del espermatozoide también podría reflejar marcas epigenéticas importantes para el posterior desarrollo embrionario (Miller *et al.*, 2010).

Organización en estructuras toroidales:

Durante la espermiogénesis la estructura nucleosomal de la cromatina se desorganiza, las histonas son reemplazadas temporalmente por las denominadas proteínas de transición y finalmente por las protaminas. Las protaminas son proteínas tan sólo presentes en espermatozoides, cuyo peso molecular es aproximadamente la mitad del de las histonas. En humanos destacan dos tipos, la P1 y la P2. El 55-79% de los residuos aminoacídicos de las protaminas son argininas, lo que les confiere una alta basicidad, permitiendo una fuerte unión al ADN que le proporciona una estructura fibrilar (Figura I-1). Además, las protaminas contienen un número significativo de residuos cisteína, que son importantes durante las etapas finales de maduración nuclear de la espermiogénesis porque se establecen múltiples puentes disulfuro entre ellas y participan activamente en la compactación de la cromatina.

El ADN unido a las protaminas se organiza en estructuras toroidales. Cada toroide contiene aproximadamente 50kb de ADN (Figura I-1), tiene de 60–100nm de diámetro y unos 20nm de grosor (Hud *et al.*, 1993). Cómo se forman los toroides y su organización sigue siendo motivo de investigación, aunque según hipotetizó Sotolongo (Sotolongo *et al.*, 2003) los toroides se unirían entre ellos mediante una región de cromatina que se uniría a la matriz nuclear espermática. Estas regiones de cromatina de estructura no toroidal son sensibles a las DNAsas (Figura I-2) y según algunos autores esta sensibilidad sería debida a que en estas regiones el ADN a su vez estaría unido a histonas (Ward, 2010).

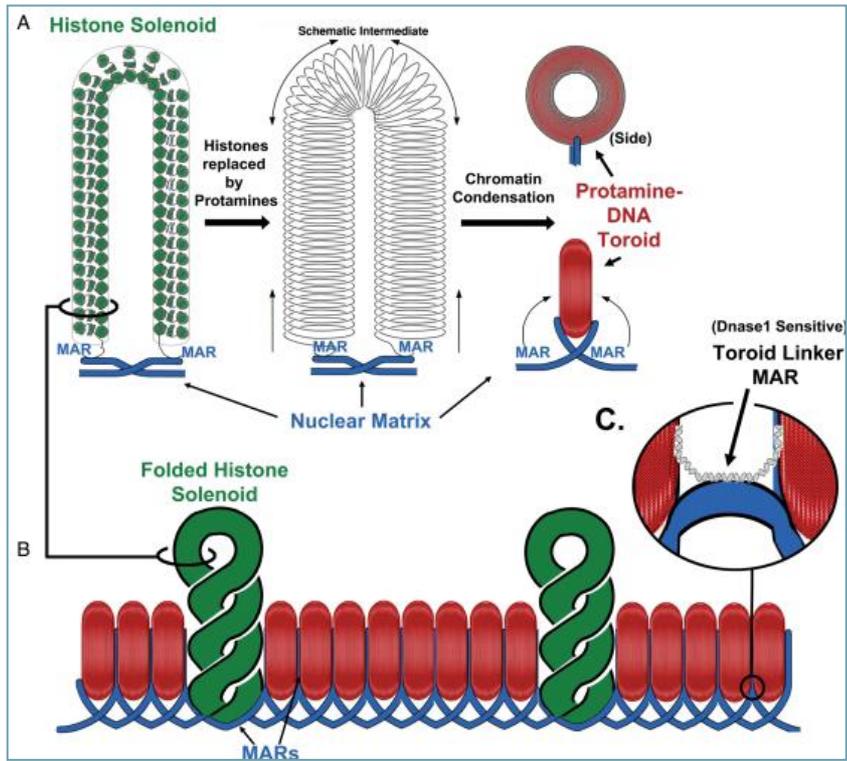


Figura I-1. Representación de los elementos estructurales de la cromatina (Ward, 2010)

ADN unido a histonas:

Hay regiones de ADN del espermatozoide que no se acomplejan con protaminas, sino que retienen histonas y mantienen una estructura nucleosomal. Dependiendo de la especie, y de la metodología utilizada para cuantificarla, se describe que entre un 2 y un 15% de la cromatina espermática de mamíferos permanecería unida a histonas. En la especie humana este porcentaje se sitúa en el 15% (Gatewood *et al.*, 1987). Entre las histonas del espermatozoide podemos encontrar variantes específicas (tH2B) e histonas convencionales (H2A, H2B, H3, H4) (Gatewood *et al.*, 1990).

Las histonas no se distribuyen al azar en el genoma espermático sino que se encuentran asociadas a secuencias y dominios de ADN específicos (Wykes and Krawetz, 2003; Arpanahi *et al.*, 2009). Se ha descrito que la presencia de cromatina con

estructura nucleosomal es frecuente en regiones ricas en genes importantes para el desarrollo, incluyendo genes imprintados, genes relacionados con la expresión de microRNA y genes HOX (Hammoud *et al.*, 2009). La localización de las histonas puede tener importantes implicaciones para la organización estructural de la cromatina espermática, ya que si las histonas se distribuyen a intervalos regulares a través del genoma podrían formar parte de una unidad de repetición de la estructura de la cromatina.

Tras la fecundación, las protaminas de los espermatozoides son substituidas por las histonas proporcionadas por el ovocito (Kopečný, 1975). Sin embargo, en las regiones donde ya había histonas, esta substitución podría no ser necesaria. Experimentos realizados por Van der Heijden demostraron que histonas con modificaciones específicas que se encontraban en el espermatozoide también estaban presentes en el pronúcleo masculino, con lo cual concluyeron que no habían sido substituidas y que la transferencia de histonas por parte de los espermatozoides sería un tipo de señal epigenético importante para el desarrollo embrionario (Van der Heijden *et al.*, 2008).

ADN unido a la matriz nuclear espermática en las regiones de anclaje a la matriz (MARs)

Tanto en células somáticas como en el núcleo espermático, la cromatina se organiza en dominios formando bucles que se unen cada 20-120 kb de longitud a la matriz nuclear (Ward *et al.*, 1989). La matriz nuclear (MAR) de los espermatozoides de mamíferos es un entramado de fibras, cuya composición proteica y organización estructural todavía no ha sido completamente caracterizada. Algunos de los componentes de la matriz nuclear espermática propuestos son la topoisomerasa 2 beta (TOP2B), la actina, la miosina, la citoqueratina, la espectrina y posiblemente la transcriptasa inversa (Shaman *et al.*, 2007b).

Algunos autores han demostrado que la matriz nuclear espermática desempeña un papel importante en la función del genoma paterno durante la embriogénesis. De hecho, se ha observado que los espermatozoides necesitan tener la matriz intacta para originar embriones viables (Ward *et al.*, 1999; Shaman *et al.*, 2007b). Algunos autores (Shaman *et al.*, 2007a) han estudiado la función de la matriz nuclear espermática

eliminando las histonas y las protaminas de los núcleos de los espermatozoides. Cuando estos espermatozoides fueron microinyectados a ovocitos normales se observó que ambos pronúcleos se podían formar correctamente y que la replicación ocurría con normalidad. Al inyectar sólo el ADN del espermatozoide en un ovocito, no se formó pronúcleo ni tampoco se replicó el ADN. Cuando se inyectaron espermatozoides cuyo ADN había sido cortado en la zona de los MARS mediante TOP2B, se formaron los pronúcleos pero el ADN paterno se degradó en el mismo momento en el que se inició la síntesis del ADN materno (Yamauchi *et al.*, 2007; 2009). Estos estudios permitieron concluir que era necesaria una adecuada asociación del ADN a la matriz nuclear para que se produzca la replicación del ADN del pronúcleo paterno y que la matriz nuclear espermática podía actuar como punto de control de la integridad del ADN espermático tras la fecundación (Ward, 2010).

Mediante el modelo de organización del ADN espermático y su relación con la matriz nuclear (Figura I-2) el núcleo espermático conseguiría no sólo un alto nivel de empaquetamiento que posibilitaría llegar al ovocito en buen estado, sino una estructura que permitiría al embrión acceder al genoma paterno siguiendo una secuencia determinada.

1.2 MECANISMOS QUE INDUCEN LA FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO:

1.2.1 Apoptosis:

La apoptosis es un fenómeno de muerte celular programada que permite eliminar células que no son necesarias, senescentes o aberrantes (Kerr *et al.*, 1972) que a diferencia de la necrosis no produce inflamación del tejido que envuelve la célula.

En general, en las células somáticas la apoptosis puede inducirse mediante mecanismos extrínsecos, actuando a nivel de membrana plasmática, citoplasmático o nuclear (Thornberry, 1998). A nivel de membrana plasmática, es un mecanismo dependiente de la interacción entre el receptor Fas (CD95) y el Fas ligando (FasL) y puede seguir dos vías (Figura I-3). La vía I involucra una proteína adaptadora que uniría la caspasa 8 al dominio citoplasmático del receptor Fas, formando un complejo inductor de muerte celular y activando la caspasa 8; la vía II hace que se libere Citocromo C de

las mitocondrias, que activan las caspasas 9. Tanto la activación de las caspasas 8 como la de las caspasas 9 desencadenan la activación de las caspasas 3, 6 y/o 7, que son las ejecutoras (Taylor *et al.*, 2004).

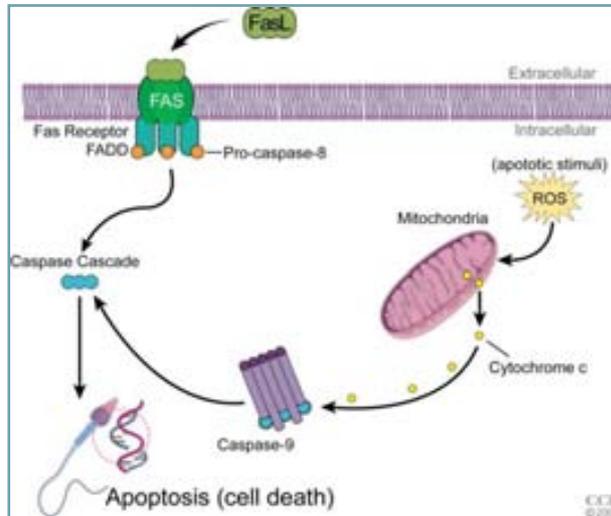


Figura I-3. Mecanismos de apoptosis en el espermatozoide (www.clevelandclinic.org)

Las caspasas son proteasas muy específicas, que mediante cortes en determinadas proteínas consiguen que éstas pierdan o cambien su función. Se ha visto que están involucradas en la desorganización del núcleo cortando las proteínas que constituyen la lámina nuclear y en la reorganización del citoesqueleto cortando proteínas que deben encargarse de su mantenimiento. Se postula que también podrían estar relacionadas con mecanismos como evitar el contacto intercelular, la replicación y reparación del ADN, interrumpir el “splicing”, degradar el ADN, inducir que la célula muestre señales para ser fagocitada y desintegrar la célula en cuerpos apoptóticos (Thornberry, 1998).

En el citoplasma, la mayoría de los procesos apoptóticos se regulan a través de las mitocondrias, que liberan moléculas proapoptóticas como los ROS (Reactive Oxygen Species) y el Citocromo C que desencadena la activación de las caspasas (Gottlieb, 2001).

A nivel nuclear, el genoma contiene genes que se transcriben en respuesta a estímulos apoptóticos. Un ejemplo sería el gen p53, que actúa regulando el ciclo celular y es un factor supresor de tumores. Cuando se produce daño en el ADN, p53 induce la apoptosis promoviendo la expresión del gen pro-apoptótico Bax (Bcl-2 associated X protein) y evitando la expresión del gen inhibidor de apoptosis Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Selivanova *et al.*, 1995).

Identificar si una célula somática está en proceso de apoptosis es posible mediante distintos marcadores. Entre estos marcadores, cabe resaltar el incremento de actividad por parte de las caspasas, la inactivación de la enzima involucrada en la reparación del ADN llamado PARP (Poly-ADPribose), la externalización de la PS (Fosfatidilserina) a la membrana plasmática para ser reconocida por los fagocitos y la fragmentación en el ADN causada por la activación de la endonucleasa CAD (Caspasa Activated DNasa) y por la proteína AIF (Apoptosis-Inducing Factor) que es liberada por las mitocondrias e introducida en el núcleo (Taylor *et al.*, 2004).

La apoptosis en los espermatozoides eyaculados se produce de una manera parecida, aunque no idéntica. En espermatozoides eyaculados se ha observado una elevada actividad de las caspasas, la externalización de la PS y la fragmentación en el ADN nuclear (Taylor *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha conseguido demostrar la acción de la proteína PARP, de la AIF, ni tampoco (a diferencia de lo que pasa en el tejido testicular) se ha observado que la vía mediada por Fas origine ningún cambio en los marcadores de apoptosis en los espermatozoides eyaculados (Sakkas *et al.*, 1999).

Tanto en las células somáticas como en los espermatozoides se ha observado la fragmentación en el ADN nuclear como consecuencia de la apoptosis. En las células somáticas, las endonucleasas producen fragmentos de aproximadamente 180 pares de bases de ADN. En los espermatozoides la degradación no se puede producir de la misma manera ya que son células transcripcional y traduccionalmente inactivas, las mitocondrias que podrían liberar las endonucleasas se encuentran en la pieza media mientras que la cromatina se encuentra en la cabeza y porque el ADN espermático se encuentra altamente empaquetado y difícilmente accesible a las endonucleasas.

Como consecuencia, según algunos autores, la fragmentación del ADN espermático no se produciría de manera inmediata por la acción de las endonucleasas

mediada por un receptor, sino que sería inducida de manera secundaria como resultado de la formación de daño oxidativo en el ADN (De Iuliis *et al.*, 2009). El único momento en el cual las endonucleasas podrían contribuir a la fragmentación del ADN sería en la etapa final del proceso (48 horas post inicio de la apoptosis), cuando la estructura interna celular empezaría a desintegrarse, y actuarían las nucleasas intracelulares integradas en la cromatina o las extracelulares del tracto genitario masculino (Sotolongo *et al.*, 2005; Boaz *et al.*, 2008).

Apoptosis homeostásica durante espermatogénesis

Durante la espermatogénesis, las células germinales se expanden clonalmente mediante divisiones mitóticas antes de iniciar la meiosis y la diferenciación a espermatozoides. En este proceso, la expansión suele ser excesiva, y el número de células se debe ajustar a la capacidad de las células de Sertoli de sustentarlas. En animales, se ha observado que la sobre-proliferación se controla mediante apoptosis (Allan *et al.*, 1992) y ésta se da de manera normal y continuada a lo largo de la vida. Un factor mediador implicado en la apoptosis de las células germinales es la proteína de membrana Fas. Utilizando inmunohistoquímica se localizó en la proteína Fas en células germinales y FasL en las células de Sertoli. Mediante la vía Fas las células germinales entran en apoptosis y que a través de ella se regula la espermatogénesis (Lee *et al.*, 1997).

Apoptosis abortiva

En los eyaculados, es posible observar espermatozoides que expresen Fas, y que por lo tanto hayan finalizado la espermatogénesis a pesar de que en realidad deberían haber acabado el proceso de muerte celular. Se ha observado que el porcentaje de espermatozoides Fas-positivos es mucho mayor en muestras de pacientes oligozoospermicos que en pacientes normozoospermicos (Sakkas *et al.*, 1999). A partir de estos datos, se concluyó que en estos pacientes la eliminación de los espermatozoides vía apoptosis no ocurría, y definió el fenómeno como “apoptosis abortiva”. Los motivos por los cuales tendría lugar este fenómeno podrían ser dos: las células de Sertoli no tendrían motivos para limitar la proliferación excesiva de células germinales en pacientes oligozoospermicos y por lo tanto no se pondría en marcha la acción para eliminarlos; o bien podría ser que la vía que active Fas no funcionara y que

este problema fuera intrínseco del paciente o una falta de sincronización entre apoptosis y espermatogénesis.

1.2.2 Empaquetamiento anormal de la cromatina:

Durante el cambio de histonas por protaminas, la acción endonucleasa de la enzima topoisomerasa II es imprescindible. Esta enzima es la responsable de cortar y reunir correctamente el ADN para reducir el estrés torsional originado. Si hay algún tipo de alteración en el control de este proceso, pueden existir roturas en el ADN que no sean reparadas (McPherson *et al.*, 1992) y que persistan en los espermatozoides.

Así mismo, se cree que las proteínas de transición, que sustituyen a las histonas durante la espermiogénesis antes de que las protaminas se unan al ADN, juegan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad del ADN espermático. En este sentido, se ha demostrado que los ratones que carecen de proteínas de transición generan espermatozoides con altos niveles de fragmentación en el ADN, una compactación defectuosa de la cromatina, y un bajo potencial de fecundación (Zhao *et al.*, 2004).

Finalmente, una correcta protaminación también es de vital importancia, mientras algunos estudios han demostrado que una escasa protaminación se relaciona con una mayor susceptibilidad al daño oxidativo (De Luliis *et al.*, 2009) y con una elevada fragmentación en el ADN (Tavalaee *et al.*, 2009) otros han observado que el ratio P1/P2 también es importante. Aunque en hombres sanos, P1 y P2 se expresan en un ratio aproximado de 1:1, se ha visto que puede existir variabilidad en la expresión y algunos autores han descrito que en pacientes fértiles normozoospermicos dicha proporción puede variar entre 0.54 y 1.43 (Nanassy *et al.*, 2011). Proporciones más elevadas se han hallado en pacientes portadores de reorganizaciones cromosómicas y en individuos con varicocele (García-Peiró *et al.*, 2011), que a su vez presentan más espermatozoides con el núcleo degradado. Un ADN poco compacto, debido a un ratio de protaminas anormal, incrementaría el porcentaje de espermatozoides con el núcleo degradado debido a que el ADN sería más accesible a la actividad nucleasa (Ribas-Maynou *et al.*, 2014).

1.2.3 Radicales libres de oxígeno:

Los ROS son agentes oxidantes generados como resultado del metabolismo del oxígeno. El término ROS engloba una amplia categoría de moléculas altamente inestables por poseer un electrón desapareado. Entre los ROS se encuentran el radical hidroxilo, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. También son consideradas una subclase de ROS las especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico y el peroxinitrito (Darley-Usmar *et al.*, 1995).

Los ROS son necesarios a nivel fisiológico para que ocurra la hiperactivación espermática, la capacitación y la reacción acrosómica (Lamirande *et al.*, 1995). Sin embargo, cuando existe un desequilibrio entre la producción de los ROS y el efecto protector del sistema antioxidante, que se encarga de neutralizar y eliminar los ROS, se origina el estrés oxidativo.

Las células germinales masculinas que se están diferenciando en los túbulos seminíferos, son muy sensibles al estrés oxidativo y dependen en gran medida de la protección que ofrecen las células de Sertoli, que poseen altos niveles de enzimas con actividad antioxidante (superóxido dismutasas, reductasas, transferasas y peroxidases del ciclo del glutatión). Una vez los espermatozoides son liberados del epitelio germinal, ya no pueden beneficiarse de la capacidad defensora de las células de Sertoli, y como células aisladas, son muy vulnerables al ataque oxidativo debido a su poca capacidad de defensa antioxidante y a la gran cantidad de PUFA (PolyUnsaturated Fatty Acids) de su membrana. Los PUFA son altamente vulnerables a los ataques oxidativos puesto que contienen grupos metil separados por dobles enlaces, con hidrógenos particularmente reactivos. Al combinar un PUFA con un radical hidroxilo se formará una molécula de agua y un ácido graso radical. El ácido graso radical es una molécula inestable, que al reaccionar con una molécula de oxígeno creará un ácido graso peroxil radical. El mismo también es una especie muy inestable por lo cual reacciona con otro ácido graso dando lugar a un ácido graso radical diferente y a un peróxido lípido o un peróxido cíclico si ha reaccionado consigo mismo. Este ciclo generará una reacción en cascada que acabará dañando la membrana.

En el tracto reproductivo masculino, el estrés oxidativo es originado por una excesiva generación de ROS por parte de los espermatozoides o leucocitos. Se ha visto que los espermatozoides inmaduros o con morfología anormal son grandes

generadores de ROS (Gomez *et al.*, 1996; Aziz *et al.*, 2004), y los leucocitos pueden generar hasta 1000 veces más ROS que los espermatozoides. Los leucocitos usan los ROS como mecanismo de defensa contra agentes infecciosos, sin embargo, su presencia en el semen también puede ser el resultado de factores ambientales, de largos periodos de abstinencia y de la presencia de varicocele (Agarwal *et al.*, 2009). Los espermatozoides tienen poca capacidad antioxidante, debido a que han perdido gran parte del citoplasma y tienen pocas enzimas antioxidantes. Además, el escaso citoplasma que tienen se localiza mayoritariamente en la pieza media y no puede proteger la membrana plasmática de la cabeza y cola espermática. Así pues, la única protección real de los espermatozoides frente a los ROS proviene de los antioxidantes extracelulares que se encuentran en las secreciones del tracto genital masculino.

Mecanismos de acción de los ROS:

Los radicales libres actúan sobre los espermatozoides provocando daño en la integridad del ADN mitocondrial y nuclear, así como la peroxidación de las membranas mitocondrial y plasmática.

El ADN mitocondrial es el más vulnerable al ataque de ROS y un marcador muy sensible al estrés oxidativo en la línea germinal. Sin embargo, como las mitocondrias paternas son eliminadas lentamente tras la fecundación, la integridad de su ADN no tendrá muchas consecuencias para el embrión resultante (Aitken *et al.*, 2011).

La importancia del estrés oxidativo en el espermatozoide recae en el efecto que pueden tener los radicales libres a nivel nuclear, ya que pueden generar roturas de cadena simple y doble en el ADN así como la modificación (oxidación o alquilación) y la delección de bases. De hecho, algunos autores postulan que la fragmentación en el ADN espermático que observaríamos sería un efecto directo del estrés oxidativo. En cuanto se produjera la oxidación de alguna base, la enzima OGG1 8 (Oxoguanina Glycosylasa 1) escindiría dicha base. La siguiente proteína APE1 (Apurinic/Apyrimidic Endonucleasa 1) de la cascada de BER (Base Excision Repair) debería dejar el final extremo 3'-OH que ha sido creado por OGG1 listo para la inserción de la nueva base, sin embargo la APE-1 no existe en el espermatozoide. En consecuencia, la completa reparación de la base escindida sólo podrá suceder por parte del ovocito en caso de que se produzca la fecundación (Aitken *et al.*, 2014).

La peroxidación de la membrana plasmática, altera tanto la estructura como la función de sus lípidos y proteínas. Se sabe que los ROS hidroxilo e hidroperoxilo pueden reaccionar con los PUFA de los fosfolípidos y de otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos que pueden alterar la estructura y función de las membranas (Alvarez and Storey, 1995; Lamirande *et al.*, 1995). Estos cambios dan lugar a una pérdida de la motilidad y afectan a eventos como la reacción acrosómica y la fusión espermatozoide-ovocito. En el caso de la peroxidación de la membrana mitocondrial se generarían aldehídos lipídicos como el 4HNE (4-Hydroxynonenal), que al unirse a proteínas de la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias estimularían la generación de ROS (Aitken *et al.*, 2014).

Origen del estrés oxidativo en el espermatozoide

Las principales fuentes de estrés oxidativo en el espermatozoide humano son la comigración de espermatozoides maduros e inmaduros durante el tránsito desde los túbulos seminíferos al epidídimo, el incremento de la edad y los factores ambientales.

Los espermatozoides, justo antes de ser liberados del epitelio germinal, se despojan de la mayoría de su citoplasma, en el cual se encuentran la mayoría de las enzimas antioxidantes que protegen a las células del estrés oxidativo. Los espermatozoides inmaduros, que contienen gotas citoplasmáticas o un exceso de citoplasma residual, generan grandes cantidades de ROS (Gomez *et al.*, 1996). Ambas circunstancias hacen que se produzca la inducción de daño de ADN en espermatozoides diferenciados debido a la presencia de espermatozoides inmaduros. Este daño ocurre después de la espermiación, durante la migración de espermatozoides desde los túbulos seminíferos al epidídimo. Aunque los ROS tienen una vida media del orden de nano a microsegundos, el hecho de que los espermatozoides se encuentren en íntimo contacto en los túbulos seminíferos y el epidídimo facilitaría que los ROS ejercieran su efecto.

Otro motivo por el cual puede aumentar el estrés oxidativo en los espermatozoides estaría causado por el varicocele, dilatación de las venas que drenan la sangre de los testículos (plexo pampiniforme), cuya frecuencia se estima que es del 35% en pacientes que presentan esterilidad primaria y del 81% en pacientes con esterilidad secundaria (Gorelick and Goldstein, 1993). Se ha observado que los

individuos con varicocele presentan altos porcentajes de fragmentación en el ADN espermático (Talebi *et al.*, 2008; Saleh *et al.*, 2003), que pueden disminuir tras realizar una varicocelectomía (Smit *et al.*, 2013; Garcia-Peiró *et al.*, 2014)

La capacidad antioxidante disminuye con la edad. Este hecho explicaría que aunque la espermatogénesis continúe hasta la senescencia y algunos hombres de edad avanzada puedan tener descendencia (Kidd *et al.*, 2001), el incremento de la edad se haya relacionado con un mayor porcentaje de daño en el ADN nuclear de los espermatozoides (Signh *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2007), una peor calidad seminal (Ng *et al.*, 2004; Levitas *et al.*, 2007), una disminución de la fertilidad (Ford *et al.*, 2000; De la Rochebrochar *et al.*, 2006), un aumento de la frecuencia de abortos espontáneos (Belloc *et al.*, 2008). En este sentido, un reciente estudio ha demostrado que en hombres de edad avanzada, una dieta rica en antioxidantes y micronutrientes reduciría el riesgo de producir espermatozoides con el ADN dañado (Schmid *et al.*, 2012).

Además, diversas publicaciones demuestran que la influencia de determinados factores ambientales podría iniciar el estrés oxidativo. Un incremento del estrés oxidativo se ha relacionado con actividades laborales en incineradoras (Oh *et al.*, 2005); contacto con insecticidas (Bian *et al.*, 2004), exposición a estireno (Migliore *et al.*, 2002), exposición a altas temperaturas (Banks *et al.*, 2005), tratamientos con agentes quimioterapéuticos para curar pacientes cancerosos (Hales *et al.*, 2005), exposición a radiaciones electromagnéticas (Aitken *et al.*, 2005) y abuso del tabaco (Fraga *et al.*, 1996; Zenzes *et al.*, 2000). Así pues, el estrés oxidativo se puede iniciar por gran variedad de factores, con graves consecuencias en el ADN si no se repara correctamente (Figura I-4).

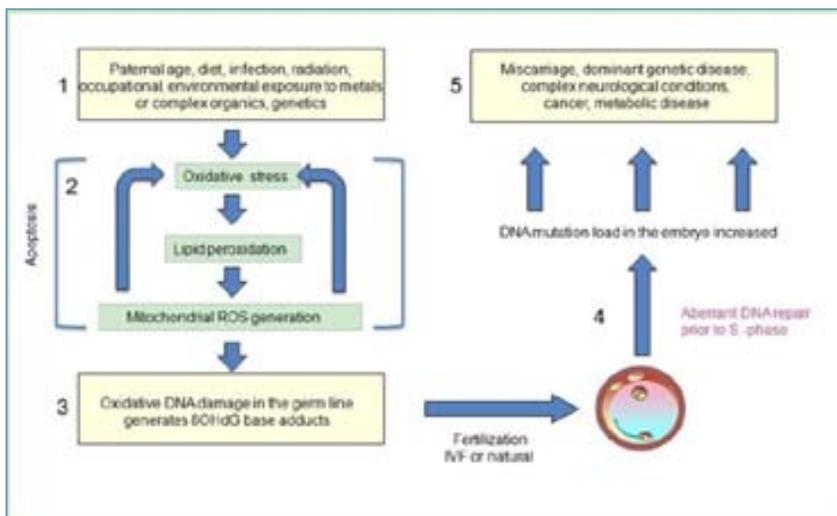


Figura I-4. Diagrama de causas y efectos del estrés oxidativo en los espermatozoides humanos (Aitken *et al.*, 2014)

En primer lugar, los ROS provocarían la peroxidación lipídica que culminaría con la producción de aldehídos lipídicos como el 4HNE, que generarían más ROS y originarían más estrés oxidativo. La enzima OGG1 escindiría las bases oxidadas, pero el resto de mecanismos de reparación tendría que ser proporcionada por el ovocito. La reparación del ADN debería producirse antes de que empezara la fase S de la primera división mitótica, y si el ovocito no reparara correctamente el daño el embrión resultante sufriría importantes consecuencias.

1.3 CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN DEL ESPERMATOZOIDE:

Se han desarrollado distintas técnicas para la detección y cuantificación del daño en el ADN, algunas ampliamente utilizadas en el estudio de células somáticas, otras que han sido diseñadas exclusivamente para las células espermáticas. Las cuatro más utilizadas en la práctica clínica son:

1.3.1 Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

Es una de las técnicas pioneras para cuantificar el daño en el ADN (Evenson *et al.*, 1980). Evalúa la susceptibilidad del ADN nuclear a la inducción de la desnaturalización *in situ*, exponiendo a los espermatozoides a condiciones ácidas (30 segundos a pH 1.2.). Posteriormente se tiñe la muestra con naranja de acridina, un fluorocromo metacromático que emite luz verde, cuando se intercala en cadenas de ADN doble (ADN intacto,) o roja, cuando se intercala en cadenas simples (ADN desnaturalizado), y se ilumina a través del punto focal de un rayo láser.

Con la ayuda de un citómetro de flujo equipado con un láser de Argón, y tras la preparación y tinción, se analizan entre 5.000 y 10.000 células a un ritmo de aproximadamente 250 células por segundo. Los datos obtenidos se vuelcan en una base de datos y el programa informático SCSAsoft® determina la proporción de espermatozoides con niveles de fluorescencia roja y verde originando el parámetro DFI (DNA Fragmentation Index). Los responsables del desarrollo de esta metodología aconsejan que las parejas con DFI superior al 25% se realicen un ciclo de ICSI, dadas

las pocas probabilidades de conseguir una gestación espontánea. Si el índice supera el 50% recomiendan el uso de espermatozoides testiculares, que según sus datos presentan menor DFI. El SCSAsoft® también proporciona el porcentaje de HDS (High DNA Stanability) que depende de la cantidad de histonas que tiene el núcleo y estará relacionado con el porcentaje de espermatozoides inmaduros. Según los mismos autores, el HDS tiene capacidad predictiva respecto el aborto (Evenson *et al.*, 2013).

La principal limitación de la técnica es que realiza una cuantificación indirecta del daño. Sin embargo, existen estudios que observan una buena correlación entre el DFI que obtiene el SCSA y la proporción de células positivas observadas mediante la técnica de TUNEL (Erenpreiss *et al.*, 2004).

1.3.2 Tdt-mediated-dUTPNick-End Labelling (TUNEL)

Es una técnica de medición directa del daño en el ADN, basada en el marcaje enzimático de las roturas de ADN. Cuantifica la incorporación de desoxyuridina trifosfato (dUTP) marcada con fluorescencia en las roturas 3'-OH de cadena simple o doble en una reacción catalizada por una enzima transferasa terminal (TdT). Así pues se obtendrá una mayor intensidad de fluorescencia cuanto mayor sea el número de roturas en el ADN.

La fluorescencia emitida se puede valorar mediante citometría de flujo así como mediante microscopía de fluorescencia (Gorczyca *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos se comparan respecto a un control negativo (incubación en ausencia de la transferasa terminal) y a un control positivo (muestras previamente tratadas con DNasa I).

La presencia de fragmentación en el ADN se puede determinar por TUNEL mediante microscopía de fluorescencia (Figura I-5) cuantificando el número de espermatozoides verdes, mientras que las cabezas azules son el resultado de la contra tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e indican que el ADN se encuentra íntegro.

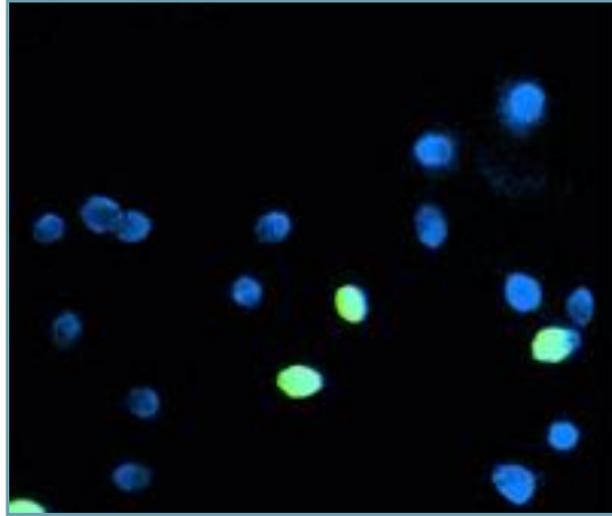


Figura I-5. Imagen de cabezas de espermatozoides tratadas para ser analizadas mediante TUNEL (<http://www.ibbiotech.com>)

Las principales ventajas de la técnica son que mide fragmentación real y que la medición que realiza es objetiva. La principal limitación de la técnica es que los kits que se comercializan se desarrollaron principalmente para medir el daño en células somáticas, cuyo ADN presenta un grado de compactación mucho menor que el espermático. Algunos autores postulan que el daño podría ser subestimado dado que los enzimas utilizados en este ensayo son moléculas de gran tamaño que podrían no alcanzar de la misma manera todas las dianas del ADN. Sin embargo la concentración óptima de los reactivos empleados ha variado respecto a otras células y se utilizan protocolos adaptados para mejorar la sensibilidad de la técnica.

1.3.3 Ensayo del COMETA:

El ensayo del cometa o técnica de SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) fue descrito por primera vez por Ostling para determinar el daño en el ADN de células somáticas (Ostling *et al.*, 1984) y se basa en la resistencia diferencial que ofrecen las moléculas de ADN de distintos tamaños cuando se mueven a través de un gel si son

sometidas a un campo eléctrico. La modificación del protocolo para estudiar la fragmentación del ADN en espermatozoides fue publicada años más tarde (Hughes *et al.*, 1996).

Para el estudio de la fragmentación en el ADN espermático, se sumergen las células en una fina capa de agarosa, se provoca la lisis celular, y se someten a electroforesis. Si se realiza la electroforesis bajo condiciones neutras, la migración de los bucles de ADN de doble cadena hacia el ánodo, formando una imagen similar a la de la cola de un cometa, es proporcional a la cantidad de roturas de doble cadena (Singh *et al.*, 1989). Si se emplean condiciones alcalinas antes y durante la electroforesis, se pueden detectar roturas de cadena sencilla, roturas de doble cadena y lugares lábiles alcalinos. Otra variante de la técnica, la SCGE bidimensional (Rivero *et al.*, 2003), permite diferenciar las roturas de cadena sencilla de las roturas de doble cadena realizando dos electroforesis secuenciales; la primera, en condiciones neutras, reflejaría las roturas de doble cadena y la segunda, en condiciones alcalinas, permitiría ver las roturas de cadena sencilla.

Según un reciente estudio que comparó los 5 métodos más utilizados para medir la fragmentación en el ADN espermático, el ensayo del COMETA alcalino sería el que mejor predeciría la esterilidad masculina, seguido del ensayo TUNEL, SCSA, SCD. El ensayo COMETA neutro no tendría esta capacidad (Ribas-Maynou *et al.*, 2013).

En cualquier caso una vez realizada la electroforesis, los espermatozoides deben ser teñidos mediante colorantes fluorescentes, y cuantificar el daño midiendo la longitud del halo generado por el material genético que se ha desplazado desde el núcleo hasta la cola. La visualización se realiza utilizando un microscopio de fluorescencia y las medidas del halo se realizan manualmente o mediante el análisis computerizado de la imagen, registrando la longitud de la cola, el porcentaje de ADN de la cola y el momento de la cola (producto de la longitud de la cola por la cantidad de ADN que se encuentra en ella).

El ensayo del cometa bidimensional teñidos permite clasificar espermatozoides en función del porcentaje y tipo de fragmentación en el ADN: 1) Sin roturas; 2) Con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena sencilla; 3) Con un nivel alto de roturas de ADN de cadena sencilla; 4) Con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena doble; 5) Con un

nivel alto de roturas de ADN de cadena doble; 6) Con un nivel bajo de roturas de ADN de cadena sencilla y doble; 7) Con un nivel alto de roturas de ADN de cadena sencilla y doble (Figura I-6).

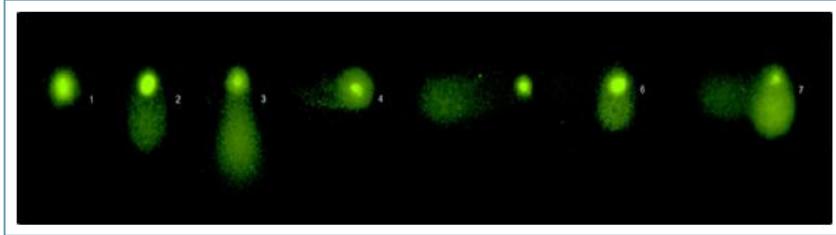


Figura I-6. Los 7 tipos de núcleos de espermatozoides teñidos con Sybr green según el ensayo del cometa bidimensional (Enciso *et al.*, 2009)

La técnica es muy sensible midiendo daño real y por este motivo proporciona información en muchos estudios de biomonitorización. Sin embargo, el procedimiento es muy laborioso, pequeñas variaciones en las condiciones de laboratorio pueden afectar a los resultados y la metodología no está totalmente estandarizada para comparar los resultados que se obtienen en los distintos laboratorios. (Valverde *et al.*, 2009)

1.3.4 Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD)

El SDC se basa en la capacidad que tiene el ADN intacto de expandirse en condiciones donde se eliminan las proteínas que le proporcionan su estructura. El SCD fue desarrollado por Fernández *et al.* (Fernandez *et al.*, 2003) y la versión optimizada de este test se comercializó en forma de kit con el nombre de Halosperm® (Fernandez *et al.*, 2005). El procedimiento consiste en sumergir los espermatozoides en una matriz de agarosa y exponerlos a soluciones de lisis. En estas condiciones, los espermatozoides con ADN fragmentado, no pueden formar un “halo”, sin embargo un ADN intacto será capaz de formarlo. Los espermatozoides pueden ser valorados utilizando tanto microscopio de campo claro como usando un microscopio de fluorescencia y clasificados en función de la presencia y tamaño del halo.

Los autores discriminan entre 5 tipos de espermatozoides: a) Con halos grandes, cuando el ancho del halo es mayor o similar al diámetro mínimo del núcleo; b)

Con halos medianos, cuando el tamaño del halo se encuentra entre el halo grande y el tamaño muy pequeño; c) Con halo muy pequeño; cuando el ancho del halo es igual o menor a una tercera parte del diámetro mínimo del núcleo; d) Sin halo o degradado; e) Similar a d pero con una tinción más débil o irregular (Figura I-7). Según los autores contendrían el ADN fragmentado los espermatozoides puntuados como “c”, “d”, ó “e”.

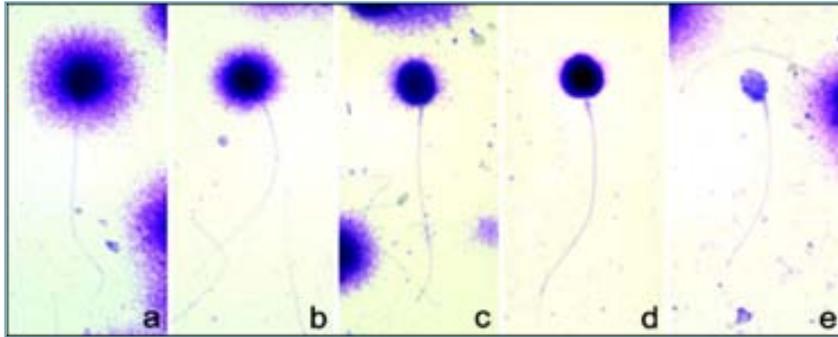


Figura.I-7. De izquierda a derecha, núcleo de espermatozoide con halo grande, mediano, pequeño, sin halo y con tinción irregular según la técnica del SCD (Fernandez *et al.*, 2003)

Las principales ventajas de este método son el poco coste económico y la rapidez de la evaluación. Sin embargo, la subjetividad cuando se debe clasificar el tamaño del halo es uno de sus principales inconvenientes. A pesar de esta limitación, la alta correlación obtenida en los estudios que comparan los valores de fragmentación obtenidos mediante TUNEL y mediante SCD ha validado su aplicación (Zhang *et al.*, 2010).

1.4 FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y ESTERILIDAD

Niveles altos de daño en el ADN se han asociado a peores parámetros seminales, como concentración, motilidad y morfología espermática, también se ha descrito daño en el ADN en pacientes estériles pero con parámetros seminales normales (Lopes *et al.*, 1998; Irvine *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2002). Por ese motivo, se ha sugerido que la integridad del ADN podría ser un marcador más objetivo de la viabilidad espermática que los análisis seminales convencionales y hay estudios que observan que los espermatozoides de los individuos estériles presentan más daño en el ADN que los espermatozoides de individuos fértiles (Saleh *et al.*, 2002).

Diversos estudios indican que cuantos más espermatozoides presenten daño en el ADN menor es la probabilidad de embarazo natural (Evenson *et al.*, 2002) y de que el embarazo llegue a término (Ribas-Maynou *et al.*, 2012).

En relación con las TRA, no hay datos concluyentes que confirmen la relación entre la integridad del ADN espermático y los resultados clínicos. Algunos autores postulan que el porcentaje de fragmentación en el ADN es significativamente menor en pacientes que consiguen el embarazo tras IAH (Inseminación artificial homóloga) que los que no lo consiguen (Duran *et al.*, 2002; Thomsom *et al.*, 2011). En cuanto al efecto que puede tener en los pacientes se someten a FIV, se ha descrito una asociación entre altos niveles de daño en el ADN y una disminución en el porcentaje de fecundación, peor calidad embrionaria y tasa de embarazo (Lopes *et al.*, 1998; Larson-Cook *et al.*, 2003; Virro *et al.*, 2004; Check *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Zini *et al.*, 2008; Avedaño *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2013;). No obstante, resultados de otros autores indican que el daño en el ADN del espermatozoide no influye en los resultados clínicos (Muriel *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2008). Un reciente meta-análisis (Practice Committee of the ASRM, 2013) concluye que aún no se dispone de suficientes datos para relacionar la integridad del ADN con los resultados reproductivos, y que el test no va a predecir la tasa de embarazo espontáneo, ni tras inseminación artificial, FIV o ICSI. Sin embargo, la relación que existe entre la fragmentación en el ADN espermático y el aborto parece más clara, y así lo indica otro meta-análisis basado en los resultados de 16 publicaciones (Robinson *et al.*, 2012).

El poco consenso que existe entre los distintos autores a este respecto puede ser debido a que el ovocito sea capaz de reparar el daño en el ADN y el del espermatozoide, y que por lo tanto el efecto que puede tener la fragmentación del ADN del espermatozoide en la consecución del embarazo dependa en gran medida del ovocito. Además, no hay unanimidad respecto a la técnica más adecuada para medir el daño en el ADN espermático, ni se ha establecido ni validado un valor a partir del cual la fragmentación del ADN espermático se deba considerar patológico. Por ejemplo, para fragmentación en el ADN medido mediante TUNEL se han propuesto umbrales del 12% (Duran *et al.*, 2002), 17.6% (Avedaño *et al.*, 2010), 20% (Sergegie *et al.*, 2005) y 36% (Henkel *et al.*, 2004).

Fragmentación y aneuploidías espermáticas

Se ha observado una correlación positiva entre la fragmentación en el ADN y la probabilidad de que el embarazo acabe en aborto (Zini *et al.*, 2005; 2008) y un mayor porcentaje de aneuploidías y de fragmentación en espermatozoides de pacientes que han sufrido abortos de repetición (Carrell *et al.*, 2003).

Un interesante estudio realizado en 4 pacientes que presentaban anomalías cromosómicas equilibradas (Perrin *et al.*, 2012) correlacionó la segregación meiótica valorada mediante FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) y la fragmentación analizada mediante TUNEL. En primer lugar vieron que el porcentaje de aneuploidías y de fragmentación estaban incrementados en los espermatozoides de estos pacientes. Además, describieron un porcentaje distinto de fragmentación en función del tipo de segregación cromosómica. Los autores justificaron sus hallazgos basándose en la teoría de la “apoptosis abortiva”, que haría que espermatozoides que deberían sufrir la muerte celular escapasen del proceso y consiguieran llegar al eyaculado. Un estudio posterior analizó simultáneamente la fragmentación y las aneuploidías espermáticas de 6 pacientes con el cariotipo alterado. Se observó, de nuevo, un mayor porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado en los espermatozoides no equilibrados, comparados con los equilibrados (Rouen *et al.*, 2013). Los autores justificaron sus resultados con la hipótesis de que los espermatozoides portadores de anomalías cromosómicas puede que tengan un núcleo tridimensionalmente alterado, haciéndolos más susceptibles a factores exógenos que indujeran la apoptosis y la fragmentación en el ADN durante el transito a través del tracto genital masculino.

1.5 MÉTODOS PARA DISMINUIR LA FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO

1.5.1 Tratamientos antioxidantes:

Con la intención de disminuir el efecto detrimental de los ROS se han propuesto distintos tratamientos orales, siendo los más comunes la Vitamina C, Vitamina E, L-Carnitina, y se han comercializado complejos antioxidantes con este objetivo (Androferti® Laboratorio Q-Pharma).

En algunos estudios se ha observado mejoría de los parámetros seminales en pacientes que han seguido estos tratamientos (Agarwal *et al.*, 2004; Nadjarzadeh *et al.*, 2014) mientras que otros no han hecho (Tunc *et al.*, 2009), y en cuanto a la fragmentación en el ADN, también existe controversia sobre si la ingesta de antioxidantes podría tener un efecto beneficioso (Greco *et al.*, 2005; Silver *et al.*, 2005; Abad *et al.*, 2013). Establecer conclusiones es difícil ya que existen pocos estudios prospectivos randomizados y se describe el uso de distintos antioxidantes, con diversas combinaciones y dosis. De hecho, una reciente revisión (Lombardo *et al.*, 2011) concluye que aun son necesarios estudios a larga escala, con criterios de inclusión más estrictos y homogeneidad en los tratamientos para valorar con rigor los efectos de los tratamientos antioxidantes.

1.5.2 MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)

La externalización de la PS de la membrana plasmática es un fenómeno universal que sucede durante la apoptosis, independientemente de la especie, del tipo celular y del mecanismo de inducción de la muerte celular. La externalización empieza cuando se inicia la fase de ejecución de la apoptosis y dura hasta la fase final, cuando se originan los cuerpos apoptóticos (Van Engeland *et al.*, 1998). La detección se lleva a cabo mediante inmunofluorescencia con anexina V, una molécula que se une específicamente a la PS traslocada a la monocapa externa de la membrana plasmática.

El aislamiento de células mediante “cell sorting” es un procedimiento que consiste en seleccionar células por características tales como el tamaño, morfología o expresión de proteínas de membrana. En el año 1977 ya se publicó que era posible hacer una separación magnética de células (eritrocitos, linfocitos y células Hela) con el uso de microesferas de hierro marcadas con fluorescencia acopladas a anticuerpos o lectinas (Molday *et al.*, 1977). La técnica se ha estado usando en investigación como método de identificación y separación celular utilizando la microscopía y la citometría de flujo. Sin embargo, su aplicación clínica se ha desarrollado mucho recientemente debido a las columnas de separación desarrolladas, patentadas y comercializadas con el nombre de MACS[®] que contienen unas matrices magnetizadas capaces de retener células unidas a microesferas de hierro (Miltenyi *et al.*, 1990).

El procesado mediante columnas de MACS[®] se basa en la incubación de los espermatozoides con microesferas acopladas a Anexina V y su posterior paso por las

columna. Los espermatozoides que presenten externalización de la PS, al ser situados en un campo magnético, quedarán retenidos en la columna (Figura I-8) mientras que los espermatozoides no apoptóticos podrán ser recuperados y utilizados para realizar un ciclo de IAH o FIV.

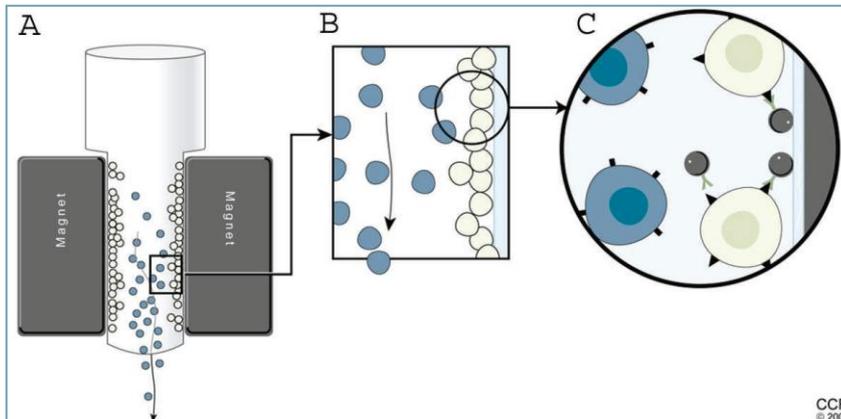


Figura I-8. Diagrama de la separación magnética mediante columna MACS®
([Http://www.clevelandclinic.org](http://www.clevelandclinic.org))

La efectividad de la técnica en la reducción del porcentaje de espermatozoides apoptóticos ha sido defendida en varias publicaciones (Grunewald *et al.*, 2001; Said *et al.*, 2006; De Vantéry Arrighi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Un reciente meta-análisis concluyó que las columnas MACS® son seguras y eficientes para seleccionar espermatozoides funcionales. Además los ciclos en los cuales la selección espermática se realiza mediante MACS® dan lugar a mejores tasas de gestación, aunque el porcentaje de implantación y de aborto es igual al de los ciclos donde no se utilizan (Gil *et al.*, 2013).

1.5.3 Reducción del periodo de abstinencia:

Según la Organización Mundial de la Salud, el periodo de abstinencia óptimo para realizar un análisis de los parámetros seminales (volumen, concentración y morfología) es entre 2 y 7 días (World Health Organization, 2010). En las clínicas de RA, de manera rutinaria, se recomienda a los pacientes que van a someterse a un ciclo de IAH o FIV que entreguen las muestras de semen tras 3-5 días de abstinencia, sin embargo no hay evidencia científica de que este periodo esté relacionado con un aumento en la probabilidad de gestar.

Parece lógico que un largo periodo de almacenamiento de los espermatozoides en la parte caudal del epidídimo debe exponerlos a un mayor daño asociado al estrés oxidativo o incluso a enzimas liberados por espermatozoides cuyas membranas se han desintegrado (Sanchez-Martín *et al.*, 2013). Son pocos y con resultados dispares los estudios que relacionen la fragmentación en el ADN espermático y el periodo de abstinencia. Algunos autores describen que ni la condensación del DNA (Oldereid *et al.*, 1984) ni la fragmentación en el ADN medida mediante SCSA (De Jonge *et al.*, 2004) se ven afectadas por la eyaculación frecuente. Sin embargo, otros autores han descrito una correlación positiva entre la abstinencia y la fragmentación del ADN medido mediante SCSA (Spanò *et al.*, 1998).

1.5.4 Procesado de la muestra espermática:

Procesar la muestra seminal es un paso imprescindible para realizar un ciclo de IAH o de FIV, que tiene como objetivo eliminar el plasma seminal y conseguir los espermatozoides con mejor motilidad y morfología. El *swim up* y los GD (gradientes de densidad) son las dos técnicas más utilizadas para procesar los eyaculados.

Swim up:

Esta técnica centrifuga la muestra de semen e incuba el pellet que han formado los espermatozoides. Durante la incubación, sólo los espermatozoides con mejor movilidad colonizan la parte superior del medio y son los que serán recuperados. El gran inconveniente que tiene esta técnica es que durante la centrifugación precipitan tanto los espermatozoides maduros como los inmaduros y los leucocitos, con el posible efecto que puede tener la generación de los ROS por parte de los dos últimos.

Gradientes de densidad:

La técnica de procesado mediante GD permite separar espermatozoides por centrifugación a través de capas de una suspensión de partículas de sílice coloidal de 17nm unidas covalentemente a moléculas de silano. El fundamento básico de esta técnica de selección de espermatozoides es que estos gametos pueden vencer la

dificultad que representan los gradientes de densidad y llegar hasta el fondo de un tubo, donde serán recogidos con una pipeta Pasteur (Bajo Arenas *et al.*, 2009).

Según la revisión bibliográfica realizada por la biblioteca Cochrane, mediante GD se consiguen mejores parámetros seminales tras el procesado (concentración de espermatozoides y tasa de recuperación de espermatozoides móviles) que mediante la técnica de *swim up*, sin embargo los resultados clínicos que se obtienen al realizar inseminaciones artificiales son independientes de la técnica utilizada para preparar las muestras seminales (Boomsma *et al.*, 2007).

Actualmente no existe consenso respecto al efecto que puede tener el método de preparación de las muestras en relación al daño en el DNA del espermatozoide. Algunos autores describen que mediante *swim up* los parámetros de daño en el DNA, valorados mediante SCSA, son mejores en la muestra procesada respecto la muestra eyaculada (Spanò *et al.*, 1999); sin embargo otros estudios no observan mejora (Younglai *et al.*, 2001). Pocos trabajos comparan la fragmentación de la misma muestra tras ser procesada mediante las dos técnicas, aunque los resultados publicados indican que mediante gradientes de densidad se consigue una mayor reducción en la presencia de espermatozoides con el ADN fragmentado (Sakkas *et al.*, 2000; Amiri *et al.*, 2012).

2 OBJETIVOS

Objetivos

- 1) Valorar el efecto del procesado mediante gradientes de densidad en la fragmentación del ADN espermático de las muestras seminales.
- 2) Analizar el impacto de la fragmentación en el ADN espermático sobre los resultados clínicos tras un ciclo de FIV con ovocitos propios o de donante.
- 3) Correlacionar la fragmentación en el ADN espermático con la presencia de anomalías meióticas en espermaticitos y/o anomalías cromosómicas en espermatozoides.
- 4) Cuantificar la eficiencia de recuperación de espermatozoides tras los gradientes de densidad y MACS[®]. Correlacionar el porcentaje obtenido en cada fracción del procesado mediante MACS[®] respecto los parámetros seminales del eyaculado.
- 5) Valorar si el uso de las columnas MACS[®] o el acortamiento del periodo de abstinencia son estrategias útiles para disminuir la fragmentación del ADN espermático.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ÁMBITO DEL ESTUDIO

Este trabajo se llevó a cabo en el IVI-Barcelona durante el periodo comprendido entre Mayo de 2007 y Enero de 2014.

El proyecto fue aprobado por el “Comité de Investigación del IVI” y los pacientes participantes firmaron el correspondiente consentimiento informado para participar en los estudios.

3.2 GRUPOS DE ESTUDIO

3.2.1 Procesado del semen y fragmentación del ADN espermático:

Se analizó la fragmentación en el ADN espermático en 109 eyaculados. La cuantificación de la fragmentación se realizó antes y después del procesado de la muestras mediante GD.

Los eyaculados provenían de pacientes que se sometieron a un ciclo de FIV entre marzo y junio del 2010. La edad media de los pacientes fue de 39.5 años (95% IC 38.3-40.6). El diagnóstico seminal, según los criterios de la OMS (World Health Organization, 2010), fue el siguiente: normozoospermia en 74 pacientes astenozoospermia en 16 pacientes; oligoastenozoospermia en 7 pacientes; oligozoospermia en 6 pacientes y teratozoospermia en 6 pacientes.

3.2.2 Fragmentación del ADN y resultados clínicos de ciclos de FIV:

Se evaluaron los resultados clínicos en relación a la fragmentación del ADN espermático en 178 parejas que realizaron un ciclo de FIV entre marzo de 2010 y junio de 2010. El método de inseminación fue FIV convencional en 62 ciclos e ICSI en 116 ciclos. Se utilizaron ovocitos propios de la paciente en 77 ciclos, y en 101 ciclos se usaron ovocitos de una donante. En la Tabla M&M-1 se detallan las características en cuanto a edad de los pacientes, origen de los ovocitos y métodos de inseminación.

Variables	Total pacientes	Tipo tratamiento	
		Ovocitos propios	Ovocitos donados
Número	178	77	101
Edad mujer, media años \pm DE	38.7 \pm 5.3	35.3 \pm 3.5	41.2 \pm 5.0
Edad varón, media años \pm DE	40.2 \pm 6.7	37.2 \pm 5.0	42.5 \pm 7.0
FIV convencional	62	20	42
ICSI	116	57	59

Tabla M&M-1. Características de la población de estudio (DE: Desviación estándar)

La donación de ovocitos fue anónima, altruista y se llevo a cabo como dicta la Ley española sobre Técnicas de Reproducción Asistida (14/2006). Las donantes de ovocitos eran voluntarias jóvenes (< 35 años). La selección de las donantes y la solicitud de pruebas se realizó siguiendo el protocolo habitual de nuestro centro (Garrido *et al.*, 2002).

3.2.3 Relación entre la fragmentación en el ADN espermático y los resultados del estudio meiótico y de anomalías cromosómicas de de espermatozoides.

El estudio sobre la relación entre la fragmentación en el ADN espermático, el estudio meiótico y el estudio de anomalías cromosómicas en espermatozoides se realizó en 60 pacientes que se sometieron a una BT (biopsia testicular) para llevar a cabo un estudio meiótico diagnóstico entre mayo del 2007 y abril del 2010. El motivo por el cual se solicitó el estudio meiótico fue por ciclos FIV previos fallidos (31 casos), por abortos previos (8 casos) y por coexistir ambas causas (21casos).

El mismo día de la intervención, los pacientes entregaron una muestra de semen para realizar el análisis de fragmentación en el ADN espermático y el estudio de FISH en espermatozoides.

Los individuos participantes en este estudio tenían una edad media de 36.8 años (95% IC 35.4–38.2). El diagnóstico seminal de estos pacientes resultó: de

astenozoospermia en 18 casos; oligoastenoteratozoospermia en 15 casos; normozoospermia en 13 casos; astenoteratozoospermia en 9 casos; oligozoospermia en 4 casos y oligoastenozoospermia en 1 caso.

3.2.4 Procesado mediante columnas MACS®

El estudio de valoración de los parámetros seminales tras procesar la muestra mediante GD y MACS® se llevó a cabo en 24 pacientes que se sometieron a un ciclo de FIV entre febrero del 2013 y febrero de 2014. En todos los pacientes, se había indicado el procesado de la muestra seminal mediante MACS® por ciclos de FIV previos fallidos.

La edad media de los pacientes fue de 39.5 ±3.9 años. El análisis seminal resultó de normozoospermia en 12 casos; oligoastenozoospermia en 7 casos; astenozoospermia en 3 casos y oligozoospermia en 2 casos.

3.2.5 Fragmentación en el ADN espermático tras columnas MACS® y acortando la abstinencia sexual

El estudio de valoración la fragmentación del ADN espermático en relación al periodo de abstinencia y a la utilización de columnas MACS® se realizó en muestras seminales de 17 voluntarios, sin problemas de esterilidad aparentes, entre julio de 2013 y enero de 2014. Los individuos participantes en el estudio entregaron una muestra seminal tras 5 días de abstinencia y otra al día siguiente.

La edad media de los varones fue 36.2 (±6.1). Cuando se realizó la valoración seminal, se observó normozoospermia en 14 individuos, astenozoospermia en 2 individuos y oligozoospermia en 1 individuo.

3.1 PROCESADO DE LAS MUESTRAS SEMINALES MEDIANTE GRADIENTES DE DENSIDAD

Los eyaculados se dejaron licuar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se valoró volumen, concentración, movilidad y morfología siguiendo los criterios de la OMS (World Health Organization, 2010).

Se prepararon gradientes discontinuos de ALLGrad® (LifeGlobal®, Guelph, Canadá) diluidos en medio Global for Fertilization® (LifeGlobal®) hasta obtener

diluciones del 45%, 70% y 90%. Se prepararon columnas de gradientes en tubos Falcon® con 1ml de cada solución, empezando por depositar la fracción del 90% en el fondo del tubo.

Tras la evaluación microscópica, las muestras seminales se lavaron con el medio Global for Fertilization® (LifeGlobal®) centrifugándose durante 10 minutos a 350g. A continuación, se depositó 1ml de la muestra seminal previamente procesada sobre la capa superior de la columna de gradientes y se centrifugó durante 18 minutos a 300g. Tras la centrifugación, se recuperó el botón celular obtenido, se resuspendió en medio Global for Fertilization® (LifeGlobal®) y se realizaron dos lavados de 5 minutos a 350g.

Tras el procesado mediante GD se realizó una segunda evaluación de los parámetros microscópicos.

3.2 CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO

Las muestras de semen se procesaron individualmente en tubos Falcon® y se lavaron con PBS (Phosphate Buffered Saline) (GIBCO®, Invitrogen, Barcelona, España) en proporción 1:2, sometiéndolas a centrifugación durante 10 minutos a 600g. Tras decantar el sobrenadante, se resuspendió el pellet y se añadió PBS hasta alcanzar un volumen final de 0.5ml. Posteriormente se fijó la muestra mediante Paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich Química S.L, Madrid, España), con agitación constante y hasta alcanzar un volumen final de 1ml.

Las muestras fijadas se conservaron refrigeradas (4°C) hasta llegar al laboratorio de Andrología de IVI-Madrid. Una vez allí se realizó un lavado en PBS (GIBCO®, Invitrogen) durante 10 minutos a 600g y se procedió a la valoración de la fragmentación del ADN espermático.

Para la determinación de la fragmentación se utilizó el Kit In situ Cell Death Detection (Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España) basado en el ensayo de TUNEL siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial.

En todos los experimentos se incluyó un control positivo donde la muestra fue incubada con DNAsa para inducir la fragmentación en el ADN, y un control negativo, sin la solución enzimática.

La cuantificación del daño se realizó mediante el citómetro FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA) a una intensidad de fluorescencia de 488 nm. En cada muestra analizada se valoró un mínimo de 10 000 células.

3.3 PROCEDIMIENTOS EN EL LABORATORIO DE FIV

La estimulación ovárica de pacientes y donantes se realizó mediante FSH (Hormona Foliculoestimulante) recombinante o con hMG (Gonadotropina Menopáusica Humana) siguiendo los protocolos establecidos en nuestro centro. La supresión hipofisaria en pacientes que seguían una estimulación de pauta larga se realizó con agonistas de GnRH (Hormona liberadora de Gonadotropina) o con antagonistas de la GnRH cuando seguían una pauta corta. Cuando tres o más folículos alcanzaron un diámetro igual o superior a 18mm se desencadenó la ovulación con HCG (Gonadotropina Coriónica Humana) y la punción folicular se realizó 36 horas más tarde.

En el caso de las receptoras de ovocitos se realizó una preparación endometrial con estradiol, y tanto la línea como el grosor endometrial se midieron de manera rutinaria antes de la transferencia embrionaria. A todas las pacientes se les suministró progesterona hasta el día de la prueba de embarazo y hasta los 3 meses siguientes cuando resultó positivo.

La preparación de las muestras de semen se realizó mediante GD, siguiendo el protocolo detallado en el apartado anterior.

Los ovocitos recuperados mediante punción folicular fueron inseminados utilizando FIV convencional o ICSI según los parámetros seminales. Los ovocitos inseminados o microinyectados se incubaron en 100 µl de HTF (Human Tubaric Fluid) suplementado al 10% con suero materno, en una atmósfera húmeda, con un 5.3% de CO₂ y 37.3°C de temperatura.

Transcurridas 16-18 horas de la inseminación o microinyección, se evaluó la correcta fecundación de los ovocitos valorando la presencia de 2 pronúcleos. La fecundación se calculó como el porcentaje de cigotos resultantes de los ovocitos inseminados o microinyectados. La morfología embrionaria se evaluó el día + 2 y + 3 de desarrollo, valorando el número, la simetría y el aspecto citoplasmático de las blastómeras; así como el tipo y el porcentaje de fragmentación y la presencia de multinucleación. La transferencia embrionaria se realizó el día + 3 y los embriones de

buena calidad sobrantes fueron congelados. Fueron considerados embriones de buena calidad en día + 3, los que presentaban entre 6–12 células, menos de un 20% fragmentación, células simétricas y ausencia de multinucleación.

El incremento en la concentración de β -HCG en suero 14 días después de la transferencia indicó embarazo. El embarazo fue considerado “clínico” cuando se observó como mínimo un saco intrauterino mediante ecografía transvaginal tras 3 semanas de la transferencia. La tasa de implantación se calculó como el ratio entre sacos gestacionales determinados ecográficamente dividido entre el número total de embriones transferidos. El aborto se definió como la pérdida del embarazo cuando éste había sido confirmado por ecografía.

3.4 FISH EN ESPERMATOZOIDES

Los eyaculados se dejaron licuar durante 30 minutos a temperatura ambiente y fueron analizados siguiendo los criterios de la OMS (World Health Organization, 2010). La preparación de la muestra se inició con un lavado, depositando el eyaculado en un tubo cónico Falcon[®] de 10ml con el medio Global for Fertilization[®] (LifeGlobal[®]) hasta completar un volumen de 10ml y que se centrifugó durante 10 minutos a 600 g. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con la solución de fijación de Carnoy (3:1; metanol: ácido acético) recién preparado, hasta un volumen final de 2ml. Finalmente se realizaron dos centrifugaciones a 1000g durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con 2ml de solución de Carnoy.

La muestra fijada se mantuvo a -20°C y se remitió a la Unidad de Biología Celular de la Universidad Autónoma de Barcelona, donde se llevó a cabo el estudio citogenético en espermatozoides mediante FISH según su protocolo habitual (Sarrate and Antón, 2009) utilizando sondas específicas para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y (AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit, Abbott Molecular Inc., Madrid, España). En cada caso se realizaron dos hibridaciones en paralelo, una con la combinación de sondas CEP X (Spectrum Green), CEP Y (Spectrum Orange) y CEP 18 (Spectrum Aqua) y otra con la combinación LSI 13 (Spectrum Green) y LSI 21 (Spectrum Orange).

El análisis microscópico se hizo en un microscopio Olympus BX-40 (Olympus Iberia, Barcelona, España), equipado con filtros específicos para visualizar los fluorocromos utilizados para cada sonda. La valoración de las señales de hibridación se

realizó siguiendo los criterios estrictos de análisis previamente descritos (Blanco, 1996) y se analizaron un mínimo 1000 espermatozoides por hibridación.

3.5 MEIOSIS EN BIOPSIA TESTICULAR

La obtención de la pulpa testicular se llevó a cabo mediante una intervención quirúrgica ambulatoria con anestesia local. La BT se realizó unilateralmente, el tejido se colocó en un tubo *Eppendorf* con suero fisiológico estéril y se mantuvo a 4°C hasta ser remitido al centro Egozcue Genetics para su análisis.

El procesado de las BT y la obtención de las preparaciones celulares se realizaron siguiendo los protocolos habituales en su centro (Egozcue *et al.*, 1983; Evans *et al.*, 1964).

El diagnóstico de los estudios meióticos se basó en el análisis de las tres fases representativas del proceso meiótico: Profase I, Metafase I y Metafase II. En el estadio de Profase I se valoraron anomalías del apareamiento cromosómico y la presencia de vesícula sexual; en Metafase I se evaluó la presencia de univalentes, desinapsis de bivalentes, disminución del número de quiasmas, separación precoz de los cromosomas sexuales y hiperploidías; en Metafases II se valoró la presencia de anomalías de cromátidas, diploidías y poliploidías

3.6 MACS[®]

La selección de espermatozoides no apoptóticos se realizó mediante la tecnología MACS[®] MicroBeads (Miltenyi Biotec S.L., Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El pellet obtenido tras los GD se incubó durante 10 minutos a oscuras con 100µl de "Dead Cell Removal MicroBeads". Se realizó un lavado durante 5 minutos a 350g con el medio de cultivo Global for Fertilization[®] (LifeGlobal[®]), se decantó el sobrenadante y se añadió 0.2ml del mismo medio al pellet.

Se colocó una columna de separación en el soporte imantado y se lavó con 0.5ml de medio para facilitar el paso de la muestra. A continuación, el pellet se dejó pasar por la columna y el precipitado se recuperó en un tubo Falcon[®] con fondo redondo de 5ml.

La fracción retenida en la columna se obtuvo tras depositar 0.2ml de medio en la columna y separar ésta del soporte imantado. La parte eluida se utilizó para realizar el ciclo de FIV.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con la versión 12.0 del paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc, Chicago, IL) y MedCalc Software (Ghent, Bélgica). Las estadistas Eurídice Martínez y Patricia Santagueda ofrecieron soporte estadístico cuando fue necesario. En todos los experimentos se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos seguían una distribución normal o no la seguían. En el caso de que se siguiera la distribución normal se usaron tests paramétricos y los no paramétricos se usaron cuando la distribución no era normal. En todos los casos, los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando se obtuvo un valor de $P < 0.05$.

3.7.1 Procesado del semen y fragmentación del ADN espermático:

Los datos fueron analizados mediante ANOVA (Analysis of variance) para ver si los valores de fragmentación variaban según el diagnóstico seminal, el test T de Student se usó para comparar la tasa de fragmentación en la muestra antes y después de ser procesada.

3.7.2 Fragmentación del ADN y resultados clínicos de ciclos de FIV:

Las comparaciones de los valores medios se calcularon mediante el test de Mann-Whitney. Se calculó la correlación de Pearson entre los porcentajes de fecundación y de implantación. Las diferencias de proporciones entre grupos se testaron utilizando la prueba de Chi-square, usando la corrección de Yates cuando se encontraron frecuencias bajas en alguna de las celdas. Las diferencias entre variables continuas se analizaron usando el test T de Student. Para comparar la fragmentación en el ADN entre las pacientes embarazadas y no embarazadas se realizó un análisis multivariable, ajustando el resultado por la edad de la mujer. La curva ROC (Receiver Operating Characteristics) se determinó para calcular la utilidad diagnóstica de la fragmentación en el ADN espermático. Se usó el umbral del 36% de fragmentación del ADN espermático para determinar si era predictivo del resultado del ciclo de FIV.

3.7.3 Relación entre la fragmentación en el ADN espermático y el análisis meiótico en tejido testicular y en el eyaculado

Los datos se analizaron mediante el test T de Student para comparar las medias del porcentaje de fragmentación en el ADN espermático de los pacientes que presentaban meiosis en BT o FISH normal versus los que la presentaban anormal. La curva ROC se determinó para calcular la utilidad diagnóstica de la fragmentación en el ADN espermático frente el diagnóstico de la meiosis en BT y el FISH en espermatozoides. La media del porcentaje de fragmentación en el ADN en función de la combinación obtenida a partir de los resultados del estudio de meiosis y del FISH en espermatozoides fue comparada mediante el test de ANOVA.

3.7.4 Procesado mediante columnas MACS

Se utilizó el test de Friedman para comparar entre sí los parámetros de las muestras seminales. Se utilizó el test de Wilcoxon para comparar las muestras por pares. Se usó el coeficiente de correlación de Spearman para estudiar la asociación entre los parámetros seminales y el porcentaje de espermatozoides que se recuperan o pierden en el procesado de las muestras.

3.7.5 Fragmentación en el ADN espermático tras columnas MACS y acortando la abstinencia sexual

Se utilizó el test de Friedman para comparar entre sí los parámetros observados en las muestras correspondientes a 5 días de abstinencia. Se utilizó el test de Wilcoxon para comparar las muestras por pares. Para analizar la relación entre las variables demográficas y el porcentaje de fragmentación en las muestras eyaculadas con 1 y 5 días de abstinencia, se utilizó, según la naturaleza de las variables, el coeficiente de correlación de Spearman o el test U de Mann-Whitney.

4 RESULTADOS

4.1 PROCESADO DEL SEMEN Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Se valoraron un total de 109 muestras correspondientes a pacientes que se sometieron a un ciclo de FIV. El porcentaje de fragmentación del ADN espermático fue independiente del diagnóstico seminal, siendo del 24.7% (95% IC 21.2-28.2) en los normozoospermicos; 33.7% (95% IC 24.8-42.5) en los astenozoospermicos; 13.4% (95% IC 2.8-24.1) en los oligoastenozoospermicos; 25.0% (95% IC 9.7-40.3) en los oligozoospermicos y 28.5% (95% IC 16.3-40.7) en los teratozoospermicos (Figura R-1).

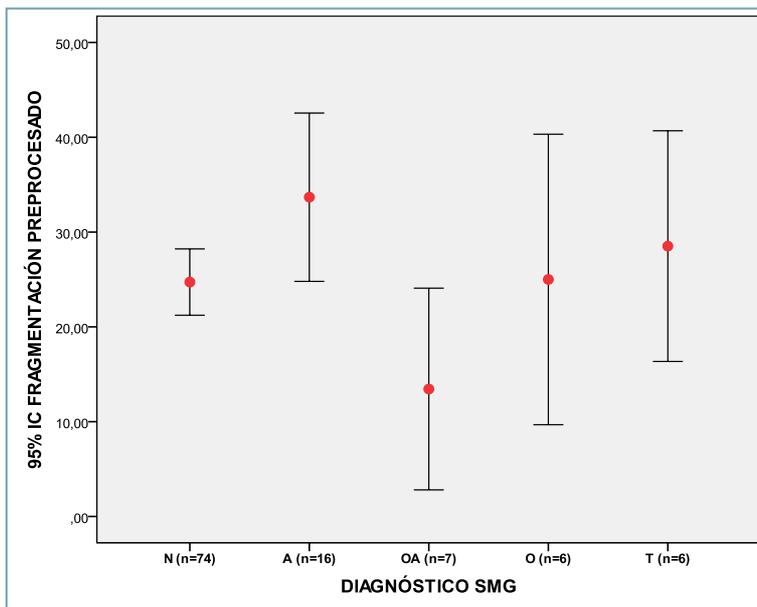


Figura R-1. Gráfico de barras de error simple representando la media de fragmentación del ADN en función del resultado del SMG. (N: normozoospermia; A: astenozoospermia; OA: oligoastenozoospermia; O: oligozoospermia; T: teratozoospermia)

Del total de muestras, 78 (71.6%) presentaban menor grado de fragmentación tras ser procesadas mediante GD que antes de ser procesadas, mientras que 31 (28.4%) no mejoraron su porcentaje de fragmentación (Figura R-2).

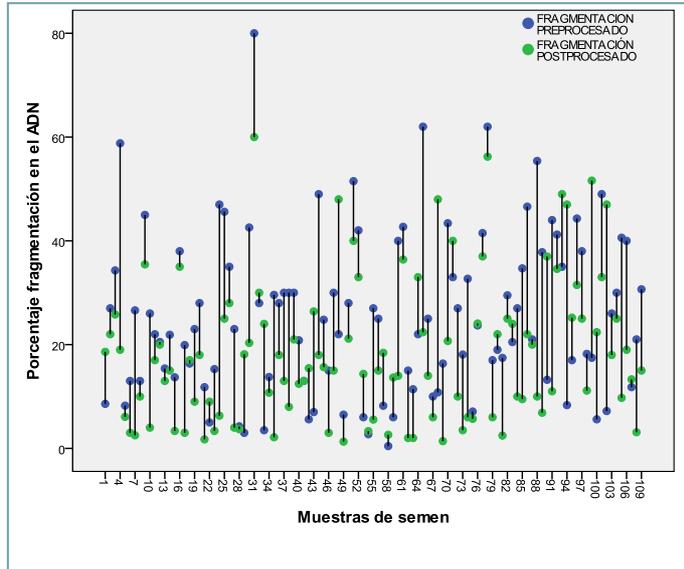


Figura R-2. Valores individuales de la fragmentación en el ADN antes y después de procesar las muestras

Los resultados globales obtenidos del estudio de fragmentación reflejan una mayor tasa de fragmentación en las muestras antes de ser procesadas (25.5%, 95% IC 22.6-28.4) respecto a las muestras procesadas con los GD (18.4%, 95% IC 15.8-21.0) ($p < 0.001$) (Figura R-3)

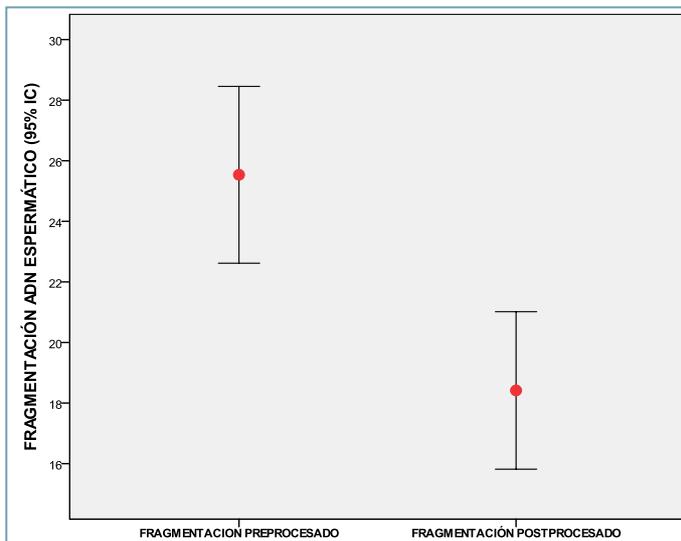


Figura R-3. Gráfico de barras de error simple representando la media y el 95% IC de la fragmentación antes y después de procesar las muestras

4.2 FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO Y RESULTADOS CLÍNICOS DE CICLOS DE FIV.

Las características de la población estudiada en cuanto a edad del varón y de la mujer, así como la técnica de inseminación y los casos en que se usaron ovocitos donados o propios se detallan en la Tabla M&M-1. Las causas de esterilidad de los 77 ciclos donde se usaron ovocitos propios y de los 101 casos de FIV donde se usaron ovocitos donados se detallan en la Tabla R-4.

Tipo tratamiento	Causas de esterilidad	Frecuencia	Porcentaje
FIV ovocitos propios	Baja respuesta ovárica	19	24.7
	Esterilidad idiopática	18	23.4
	Endometriosis	8	10.4
	Ovulación irregular	7	9.1
	Edad materna avanzada	7	9.1
	Factor tubárico	7	9.1
	Mala calidad ovocitaria	5	6.5
	Fallo de IAH	4	5.2
	Aborto de repetición	1	1.3
	Anexectomía	1	1.3
FIV ovocitos donados	Edad materna avanzada	52	51.5
	Fallo ovárico	29	28.7
	Endometriosis	9	8.9
	Enfermedad genética	4	4.0
	Menopausia	4	4.0
	Fallo de TRA previa	2	2.0
	Mala calidad ovocitaria	1	2.0

Tabla R-4. Causas de esterilidad en los pacientes que se sometieron al tratamiento de FIV.

Las frecuencias de la fragmentación del ADN espermático en las muestras de semen analizadas se expresan en el histograma de la Figura R-5. El porcentaje medio

Resultados

de fragmentación en el ADN después de procesar la muestra mediante GD fue del 19.5% (95% IC 17.1-22.0).

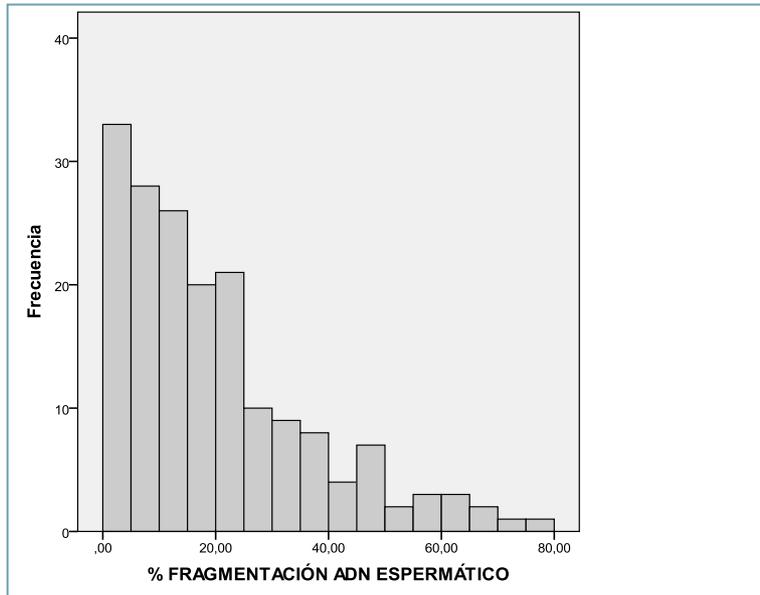


Figura R-5. Histograma de la frecuencia de la fragmentación en el ADN en la población de estudio, tras GD

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje medio de fragmentación de los pacientes que utilizaron ovocitos propios (20.3%, 95% IC 16.5–24.2) y los que usaron ovocitos de donante (18.9%, 95% IC 15.7–22.1) ($P = 0.58$; NS).

No se halló relación entre la tasa de fecundación y la fragmentación en el ADN cuando se tuvieron en cuenta todos los ciclos ($r = -0.01$, $P = 0.86$; NS), ni tampoco cuando se valoraron por separado los ciclos en los que se usó la técnica de FIV ($r = 0.08$, $P = 0.52$; NS) o la de ICSI ($r = -0.04$, $P = .64$; NS). Respecto al efecto que podía tener la fragmentación en el ADN espermático en la calidad embrionaria, se observó que la fragmentación era similar cuando se obtenía un porcentaje de embriones de buena calidad $< 50\%$ (22.02%, 95% CI 18.0–26.0) que cuando el porcentaje de embriones de buena calidad era $\geq 50\%$ (17.9%, 95% CI 14.8–21.0) ($P=0.11$; NS).

Resultados

En 161 ciclos se realizó transferencia embrionaria, sin embargo en 17 ciclos no se consiguieron embriones de suficiente calidad para ser transferidos. La fragmentación en el ADN espermático fue similar en los ciclos con transferencia (19.4%, 95% IC 16.8–22.0) respecto a los que se canceló la transferencia (21.2%, 95% IC 13.0–29.5) ($P=0.46$; NS).

La tasa de gestación clínica global fue del 54.0% (87/161). La tasa de embarazo en pacientes que utilizaron ovocitos propios fue del 46.2% (30/65), y del 59.4% (57/96) en los ciclos donde se usaron ovocitos de donante. Las pacientes que consiguieron un embarazo eran significativamente más jóvenes, tanto en el grupo de ovocitos propios como donados (Tabla R-6). Otras variables, tales como la edad del varón, la fragmentación en el ADN espermático y el número de embriones transferidos fueron similares. El porcentaje de fragmentación en ADN espermático fue superior, aunque no estadísticamente significativo, en pacientes que sufrieron abortos ($n = 13$) (28.0%, 95% IC 17.1–39.0) respecto los que consiguieron un embarazo evolutivo ($n = 74$) (18.1%, 95% IC 14.9–21.3) ($P=0.056$).

Grupos de estudio	Edad mujer	Edad varón	% f ADNe	ET
FIV con ovocitos propios				
Embarazo, n = 30	33.9 ± 3.1	37.0 ± 4.7	21.2 ± 16.6	2.1 ± 0.3
No embarazo, n = 35	36.2 ± 3.6	37.4 ± 4.9	18.2 ± 17.5	2.0 ± 0.8
Valor P	0.007	NS	NS	NS
FIV con ovocitos donados				
Embarazo, n = 57	40.2 ± 5.2	42.0 ± 6.8	18.7 ± 13.8	2.0 ± 0.3
No embarazo, n = 39	42.8 ± 4.4	43.1 ± 7.6	19.9 ± 20.0	2.0 ± 0.3
Valor P	0.011	NS	NS	NS

Tabla R-6. Tabla representando las diferencias entre mujeres embarazadas y no embarazadas. Los datos se representan como media ± DE (% f ADN: porcentaje de fragmentación ADN espermático, ET: número de embriones transferidos)

A partir de estos datos, se analizó si los resultados de los ciclos variaban cuando el porcentaje de fragmentación era bajo o elevado, utilizando como punto de corte el valor del 36% propuesto en un estudio previo (Henkel *et al.*, 2004). Nuestros datos no evidenciaron ningún efecto en los resultados clínicos para ninguno de los parámetros evaluados (Tabla R-7).

Resultados

Variables	Pacientes que usaron sus		Receptoras de ovocitos	
	Frag.< 36%	≥ 36%	< 36%†	≥ 36%†
Nº pacientes	63	14	86	15
Edad mujer	35.1 ± 3.5	36.2 ± 3.4	41.2 ± 5.2	41.5 ± 3.3
Nº ET	2.1 ± 0.6	2.0 ± 0.8	2.0 ± 0.3	2.1 ± 0.5
% TE	85.7 (54/63)	78.6 (11/14)	94.2 (81/86)	100 (15/15)
% Gestación	48.1 (26/54)	36.4 (4/11)	61.7 (50/81)	46.7 (7/15)
% Aborto	11.5 (3/26)	50.0 (2/4)	10.0 (5/50)	42.9 (3/7)
% Implantación	30.0(34/113)	31.8 (7/22)	47.8 (78/164)	32.2 (10/31)

Tabla R-7. Variables estudiadas y resultado clínico utilizando como umbral el 36% de fragmentación en el ADN espermático. Los valores se representan como la media ± DE *,TE: transferencia embrionaria. †P = NS en todas las comparaciones

Por otra parte, cuando la fragmentación en el ADN era superior al 15%, la sensibilidad y especificidad para predecir el embarazo fueron del 56.3% y del 64.9%, respectivamente, con una área bajo la curva ROC del 0.552. Las figuras correspondientes al aborto obtuvieron un 38.5% de sensibilidad, un 91.9% de especificidad, y una área bajo la curva ROC del 0.666 (Tabla R-8).

Variables	Umbral de fADNe	% Sensibilidad	% Especificidad	Área bajo la curva ROC
Consecución de embarazo				
Todos los pacientes	> 15%	56.3	64.9	0.552
FIV con ovocitos propios	> 11%	76.7	54.3	0.599
FIV con ovocitos donados	> 15%	56.1	64.1	0.528
Aborto				
Todos los pacientes	> 35%	38.5	91.9	0.666
FIV con ovocitos propios	> 13%	100	40.0	0.652
FIV con ovocitos donados	> 21%	62.5	67.3	0.670

Tabla R-8. Diagnóstico de precisión de la fragmentación en el ADN espermático usando la usando la técnica de TUNEL para predecir el embarazo y el aborto

4.3 RELACION ENTRE LA FRAGMENTACION EN EL ADN ESPERMÁTICO, EL ANÁLISIS MEIÓTICO EN TEJIDO TESTICULAR Y LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOZOIDES.

Los individuos que se sometieron a este estudio tenían una edad media de 36.8 años (95% IC 35.4–38.2), mientras que sus parejas tenían 35.8 años (95% IC 34.7–36.9). En la población, la media de años de esterilidad de las parejas era de 4.0 (95% IC 3.2–4.7), la media de ciclos previos a los que habían sido sometidos era de 2.3 (95% IC 1.9–2.8) y la media de abortos previos era de 0.9 (95% IC 0.6–1.2).

En estos pacientes, el porcentaje medio de fragmentación en el ADN de los espermatozoides eyaculados era del 25.4% (95% IC 22.0-28.9) y las frecuencias de la variable se pueden observar en el histograma que se presenta en la Figura R-9.

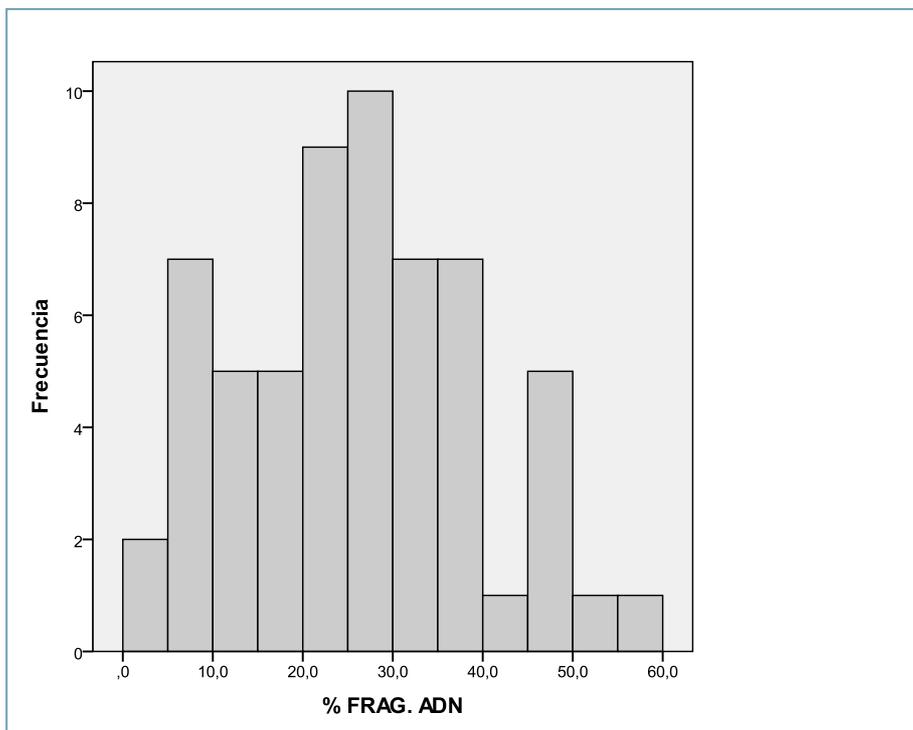


Figura R-9. Histograma de la frecuencia de la fragmentación en el ADN en la población de estudio

Resultados

El diagnóstico del estudio meiótico en BT resultó anormal en 43 pacientes (71.7%); Normal en 15 (25.0%) y no concluyente en los 2 restantes (3.3%) (Figura R-10).

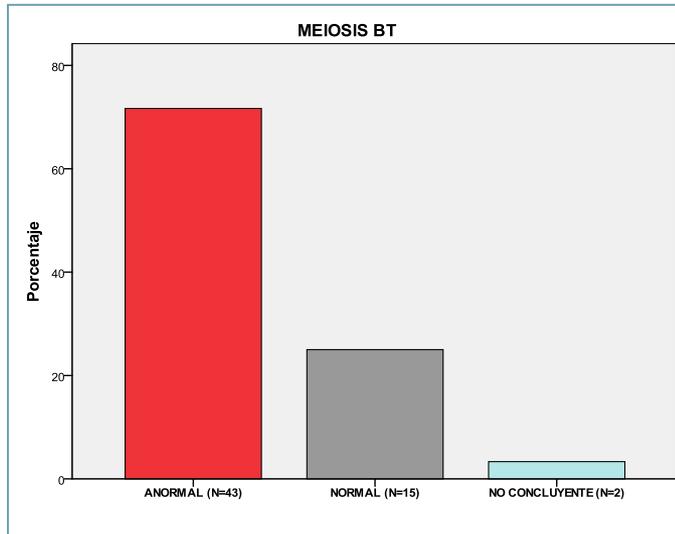


Figura R-10. Gráfico de barras con las frecuencias de los resultados obtenidos tras el análisis de la meiosis en BT

En cuanto al estudio de FISH en espermatozoides, resultó anormal en 28 pacientes (46.7%) y normal en los 32 restantes (53.3%)(Figura R-11).

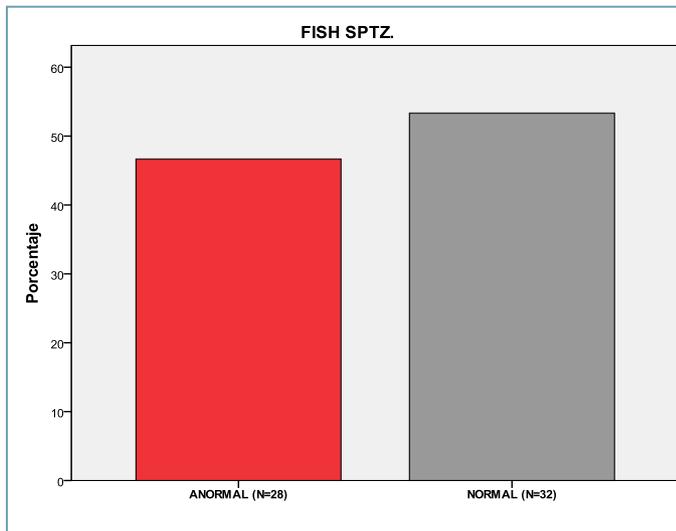


Figura R-11. Gráfico de barras con las frecuencias de los resultados obtenidos tras el análisis de la meiosis en BT

Resultados

No se observó correlación entre el resultado del análisis meiótico en tejido testicular y las anomalías cromosómicas en espermatozoides (Tabla R-12).

	Meiosis normal	Meiosis anormal	Meiosis no concluyente	TOTAL
FISH anormal	5 (8.3%)	23 (38.3%)	0 (0%)	28 (46.7%)
FISH normal	10 (16.7%)	20 (33.3%)	2 (3.3%)	32 (53.3%)
TOTAL	15 (25.0%)	43 (71.7%)	2 (3.3%)	60 (100%)

Tabla R-12. Frecuencias de las combinaciones obtenidas a partir de las 2 pruebas diagnósticas.

No se halló correlación entre el diagnóstico seminal y el resultado del estudio meiótico (Tabla R-13).

	DIAGNÓSTICO SMG					
	A (N=18)	AT (N=9)	N (N=13)	O (N=4)	OA (N=1)	OTA (N=15)
MEIOSIS N (N=15)	6 (33.3%)	1 (11.1%)	5 (38.5)	0 (0.0%)	1 (100%)	2 (13.3%)
MEIOSIS AN (N=43)	11 (61.1%)	8 (88.9%)	7 (53.8%)	4 (100%)	0 (0%)	13 (86.7%)
MEIOSIS NC (N=2)	1 (5.6%)	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabla R-13. Frecuencias de los diagnósticos seminales en función del resultado del análisis meiótico. (N: normal; AN: anormal; NC: no concluyente)

Tampoco se observó ninguna relación cuando se estudió la correlación entre el diagnóstico seminal y el resultado del análisis citogenético en los espermatozoides (Tabla R-14).

Resultados

	DIAGNÓSTICO SMG					
	A (N=18)	AT (N=9)	N (N=13)	O (N=4)	OA (N=1)	OTA (N=15)
FISH A (N=28)	11 (61.1%)	2 (22.2%)	5 (20.0%)	1 (25.0%)	0 (0.0%)	9 (60.0%)
FISH N (N=32)	7 (38.9%)	7 (77.8%)	8 (61.5%)	3 (75.0%)	1 (100%)	6 (40.0%)

Tabla R-14. Frecuencias de los diagnósticos seminales en función del resultado del FISH en espermatozoides.

La fragmentación en el ADN fue similar en los pacientes que presentaban un diagnóstico de meiosis normal, anormal o no concluyente siendo 22.4% (95% IC 14.1-30.7); 25.37% (95% IC 22.4-30.3) y 27.5% (-105.9-160.9), respectivamente. El área bajo la curva ROC de la fragmentación en el ADN para predecir la anomalía del estudio meiótico resultó 0.558 (Figura R-15).

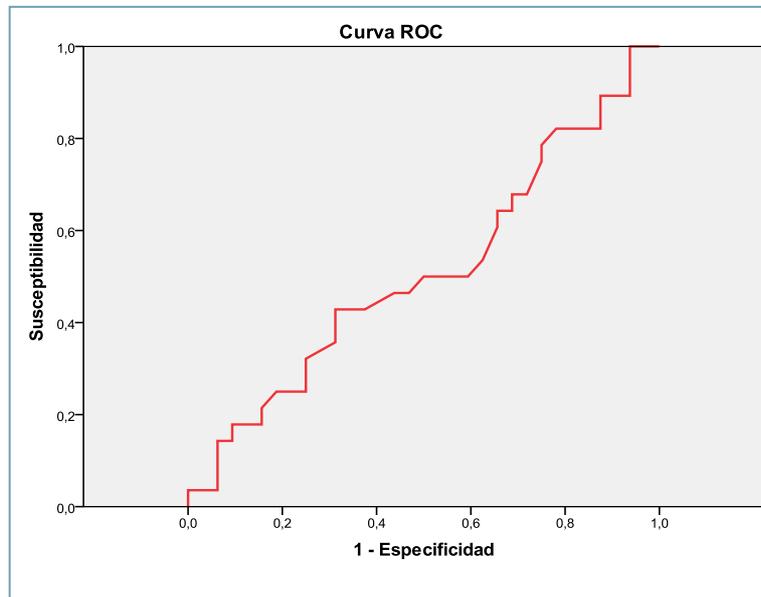


Figura R-15. Curva ROC de la fragmentación del ADN espermático respecto al resultado de la meiosis en BT

Resultados

Cuando se evaluó la media de fragmentación en el ADN según el resultado que se había obtenido en el estudio de FISH en espermatozoides no se encontraron diferencias entre los pacientes cuyo diagnóstico fue normal respecto de los que fue anormal, situándose los porcentajes en el 24.9% (95% IC 20.3-29.6) y el 25.9% (95% IC 20.5-31.3), respectivamente. El área bajo la curva ROC de la fragmentación para predecir un resultado de FISH anormal fue del 0.511 (Figura R-16)

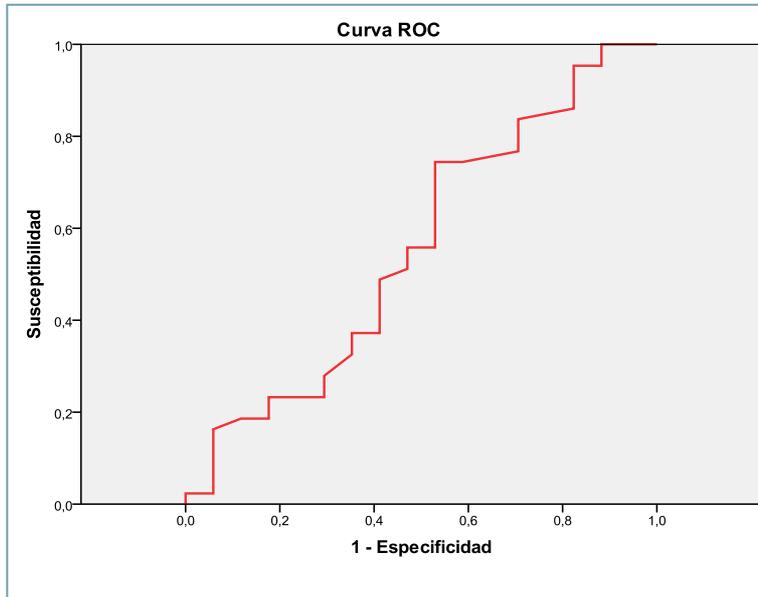


Figura R-16. Curva ROC de la fragmentación del ADN espermático respecto al resultado del estudio de FISH en espermatozoides

Se analizó la correlación entre la fragmentación en el ADN espermático, el diagnóstico del estudio meiótico en BT y el resultado del estudio de FISH en espermatozoides. No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el porcentaje de fragmentación en el ADN en los grupos creados a partir de las distintas combinaciones entre los estudios meióticos en BT y el estudio citogenético en espermatozoides (Tabla R-17).

Resultados

Grupos	% fADNe	95% IC
Meiosis anormal y FISH anormal	26.9%	20.8 -33.1
Meiosis anormal y FISH normal	26.1%	21.1-31.2
Meiosis normal y FISH normal	21.7%	8.6-34.8
Meiosis normal y FISH anormal	21.2%	5.6-36.8
Meiosis no concluyente y FISH normal	27.5%	-105.9-160.9

Tabla R-17. Media del porcentaje de fragmentación en el ADN en función de los resultados de la meiosis y del estudio de FISH en espermatozoides.

4.4 PROCESADO MEDIANTE COLUMNAS MACS®:

La finalidad del experimento fue comparar los parámetros seminales de 24 muestras de pacientes bajo 4 condiciones: antes de procesar (Pre-procesado); pellet obtenido tras procesar la muestra mediante GD (Post GD); fracción retenida en la columna de MACS® (Columna) y la eluida tras pasar por la columna (Post MACS®). En la Tabla R-18 se detallan los resultados globales obtenidos tras el análisis seminal.

Variables	Pre-procesado	Post GD	Columna	Post MACS®
Volumen	3.4(3.1-5.1) ^A	0.2(0.2-0.2) ^B	0.2(0.2-0.2) ^B	0.2(0.2-0.4) ^B
Concentración espermática (M/ml)	35.6(11.0-60.1) ^A	11.0(3.9-26.0) ^B	2.6(1.2-8.7) ^C	2.5(1.3-16.0) ^D
Total espermatozoides (M)	126.0(34.2-227.6) ^A	2.2(0.8-5.2) ^B	0.6(0.3-2.1) ^C	0.8(0.4-3.2) ^D
Espermatozoides mótils (%)	50.0(38.3-59.8) ^A	88.5(82.3-94.0) ^B	90.0(73.5-94.0) ^B	93.5(89.3-96.0) ^C
Total espermatozoides mótils (M)	56.6(14.8-123.8) ^A	2.0(0.7-4.8) ^B	0.5(0.2-1.8) ^C	0.8(0.4-3.0) ^D
Espermatozoides progresivos (%)	34.5(25.0-39.8) ^A	81.5(70.0-89.8) ^B	81.0(63.3-88.0) ^B	87.0(82.3-90.0) ^C
Total espermatozoides progresivos (M)	34.4(9.0-87.2) ^A	1.8(0.5-4.5) ^B	0.5(0.1-1.2) ^C	0.7(0.4-2.9) ^D

Tabla R-18. Parámetros seminales de las 4 fracciones. Los resultados se expresan mediante la mediana y el P25-P75. Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas.

Resultados

La motilidad espermática en las cuatro fracciones se ilustra en la gráfica de la figura R-19.

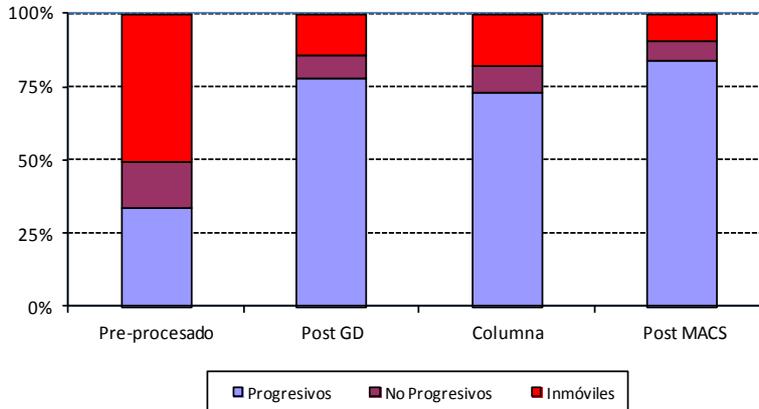


Figura R-19. Gráfica realizada a partir del porcentaje de espermatozoides según su motilidad en las 4 fracciones analizadas

Se calculó el ratio de espermatozoides que formaba parte de cada una de las fracciones por paciente. A partir de la media de todos los ratios se calculó el porcentaje de recuperación. Tras el GD se recuperó el 2.6% del total de espermatozoides de la muestra de eyaculado y el 6.4% de los espermatozoides progresivos. Tras el procesado a través de la columna MACS[®] y respecto a la muestra post GD, se recuperó el 57.9% del total de espermatozoides y el 63.4% de los espermatozoides progresivos

El porcentaje de espermatozoides retenido en la columna, respecto a la muestra post GD, fue el 35.4% del total de espermatozoides y el 32.7% de los espermatozoides progresivos. El 6.6% de los espermatozoides totales y el 3.9% de los progresivos se perdió al realizar el procesado mediante MACS[®]

Finalmente, el porcentaje de espermatozoides recuperados post-MACS[®] respecto a la muestra eyaculada, fue del 1.5% del total de espermatozoides y del 4.0% de los espermatozoides progresivos

Se analizó la posible relación entre los parámetros seminales y el porcentaje de espermatozoides que quedaba retenido en la columna y se observó una asociación inversa entre el porcentaje de espermatozoides progresivos en la muestra eyaculada y

Resultados

el porcentaje de espermatozoides retenidos en la columna MACS[®] ($\rho=-0.456$, $p=0.025$; coeficiente de correlación de Spearman).

4.5 FRAGMENTACION EN EL ADN ESPERMÁTICO TRAS COLUMNAS MACS[®] Y ACORTANDO LA ABSTINENCIA SEXUAL

De los 17 individuos que se incluyeron en este estudio, 9 varones no habían sentido el deseo de tener descendencia y 8 tenían hijos. La edad media era de 36.2 (± 6.1) años, con un mínimo de 27 y un máximo de 53 años. Las principales características de la población estudiada se muestran en la Tabla R-20. En cuanto al sedentarismo, calculado como el número de horas que permanecían sentados al día, era de 5.1 (± 2.3) horas de media.

Variable	Frecuencia	Porcentaje
<i>Nº hijos</i>		
Sin hijos	9	52.9%
1 hijo	2	11.8%
2 hijos	5	29.4%
3 hijos	1	5.9%
<i>Varicocele</i>		
No	16	94.1%
Si	1	5.9%
<i>Nº cigarrillos</i>		
0	14	82.4%
1	1	5.9%
20	2	11.8%

Tabla R-20: Parámetros epidemiológicos de la población de estudio

Se analizaron los parámetros seminales en 4 fracciones: eyaculado tras 5 días de abstinencia (Abst5.Eyaculado); pellet obtenido tras el procesado mediante GD (Abst5.PostGD); eluido tras el procesado mediante MACS[®] (Abst5.PostMACS[®]) y eyaculado tras 1 día de abstinencia antes de procesar (Abst1.Eyaculado).

Resultados

Se observó un mayor volumen seminal tras 5 días de abstinencia respecto a los valores de las muestras obtenidas tras 1 de abstinencia (3.2ml vs 2.2ml; $p=0.05$). El resto de datos obtenidos en cuanto a los otros parámetros se detallan en la Tabla R-21.

Variables	Abst5.	Abst5.	Abst5.	Abst1.
	Eyaculado	PostGD	PostMACS®	Eyaculado
Concentración espermática (M/ml)	83.1(35.7-123.8)	61.2(32.0-104.5)	16.0(6.9-26.3)*	73.4(34.3-105.5)
Total spz (M)	294.0(119.0-397.4)*	9.60(5.3-20.4)*	6.4(2.8-10.3)*	145.7(95.6-251.7)
Sptz móviles (%)	55.0(52.0-64.0)	96.0(93.0-96.0)*	96.0(94.0-97.0)*	55.0(49.0-68.5)
Total spz móviles	183.8(68.2-206.3)*	9.2(5.0-19.5)*	6.1(2.7-9.8)*	88.9(48.3-148.5)
Sptz progresivos (%)	40.0(34.5-46.0)	90.0(83.5-93.5)*	91.0(89.0-93.5)*	40.0(33.5-47.5)
Total spz progresivos	121,7(46.8-144.7)*	8.9(4.8-18.5)*	26.6(2.6-9.3)*	63.4832.1-104.2)

Tabla R-21. Parámetros seminales de las 4 fracciones analizadas. Los datos obtenidos se expresan mediante la mediana y el P25-P75. * $p<0.05$ respecto a Abst1.Eyaculado

El porcentaje de espermatozoides según su motilidad en las 4 fracciones se puede observar en la gráfica de la Figura R-22.

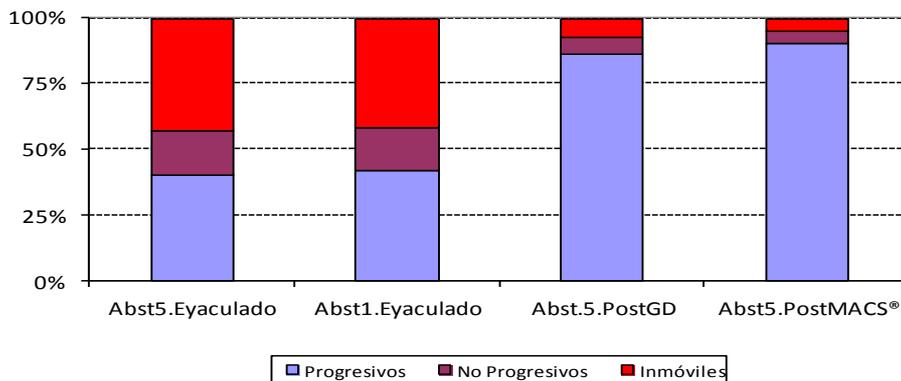


Figura R-22: Gráfica representando el porcentaje de espermatozoides según su motilidad en las 4 fracciones

Resultados

La motilidad (progresiva, in situ y total) fue igual en las muestras obtenidas tras 5 días de abstinencia que en las muestras obtenidas tras 1 día. Tras procesar la muestra mediante GD se obtuvo un significativo incremento de la motilidad ($p < 0.001$; test de Wilcoxon) que aun fue superior tras el paso por columnas MACS[®].

Finalmente, se valoró el porcentaje de fragmentación en el ADN espermático (%fADNe) mediante TUNEL en las 4 fracciones (Tabla R-23.). Se observó un descenso significativo de la fragmentación en el ADN espermático tras los GD, que era aun mayor tras la utilización de MACS[®]. Así mismo, obteniendo la muestra tras un día de abstinencia conseguimos una disminución significativa de la fragmentación en el ADN respecto a la que observábamos tras 5 días.

	Abst5.Eyaculado	Abst5.PostGD	Abst5.PostMACS [®]	Abst1.Eyaculado
% fADNe	7.8(2.3-9)*	6.2(2.4-9.1)	5.4(1.9-7.4)	4.2(1.9-7.4)

Tabla R-23. Fragmentación en el ADN espermático de las 4 fracciones expresada mediante la mediana y el P25-P75. * $p < 0.05$ respecto a Abst1.Eyaculado.

5 DISCUSIÓN

5.1 PROCESADO DEL SEMEN Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

El procesado de la muestra de semen para eliminar el plasma seminal y los posibles leucocitos presentes en la muestra, así como para seleccionar los espermatozoides con mejor motilidad, es imprescindible para realizar cualquier TRA. Las dos técnicas más utilizadas en los laboratorios de FIV son el *swim up* y los GD. Aunque está demostrada la utilidad de ambas metodologías para seleccionar los espermatozoides en función de su motilidad, no existe consenso sobre su efectividad y eficiencia para seleccionar los espermatozoides con menor grado de fragmentación en el ADN (Spano *et al.*, 1999; Sakkas *et al.*, 2000; Younglai *et al.*, 2001; Amiri *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, mostraron una disminución significativa en la tasa de fragmentación en el ADN cuando se comparó la muestra procesada mediante GD respecto a la muestra antes de procesar. Estos datos eran los esperados, teniendo en cuenta que en la muestra eyaculada se encuentran espermatozoides móviles, inmóviles y no viables en general. Los espermatozoides inmóviles (vivos o no) tienen más probabilidad de presentar el ADN fragmentado que los espermatozoides móviles, dado que la apoptosis espermática tiene como consecuencia disminuir la motilidad de la célula y finalmente fragmentar el ADN nuclear (Aitken *et al.*, 1989; Lamirande *et al.*, 1995). Así pues, los resultados del análisis de fragmentación del ADN espermático en el eyaculado serían un reflejo de estas distintas poblaciones espermáticas, con el consecuente aumento en la media de la fragmentación por parte de los espermatozoides inmóviles.

Otros autores (Liu and Liu, 2013) obtuvieron resultados similares a los nuestros cuando analizaron el porcentaje de ADN fragmentado mediante el método de naranja de acridina en muestras eyaculadas y en la fracción recuperada tras GD. La muestra procesada presentó 3 veces menos fragmentación que la muestra eyaculada. En otro interesante estudio (Amiri *et al.*, 2012) se procesaron las muestras mediante *swim up* y mediante GD, y se valoró la fragmentación en el ADN en la muestra eyaculada y procesada mediante el ensayo del cometa. Los resultados demostraron que ambos métodos de procesado eran beneficiosos en cuanto a la obtención de espermatozoides

con menor grado de fragmentación y, cuando se analizó cuál de los dos métodos era más efectivo, se observó que los espermatozoides recuperados tras GD tenían la media de fragmentación significativamente menor que los que se recuperaron mediante *swim up*. Así mismo, el porcentaje de recuperación de espermatozoides con motilidad y morfología normal fue superior cuando se utilizaron los GD. Otro estudio realizó un experimento similar, procesando la muestra mediante *swim up*, GD y la combinación de *swim up* + GD (Jayaraman *et al.*, 2012). Los tres métodos disminuyeron el grado de fragmentación respecto la muestra eyaculada, siendo la técnica combinada *swim up* + GD la que más redujo dicha fragmentación.

Dado que el procesado de las muestras de semen se realiza bajo un protocolo que depende del centro y es una técnica totalmente manual, los resultados pueden variar en función del laboratorio y de lo selectivos que se sea recuperando las fracciones. Se ha descrito que los protocolos que centrifugan repetidamente los espermatozoides podrían estar induciendo daño iatrogénico (Twigg *et al.*, 1998), y que aumentando el tiempo de incubación de las muestras a 37°C incrementaríamos significativamente el daño en el ADN (Dalzell *et al.*, 2004). Basándose en estas observaciones, hay autores que han postulado que tanto la centrifugación como la incubación inducen la apoptosis a través de la acción de los ROS (Jayaraman *et al.*, 2012). Acorde con lo publicado, el método utilizado en nuestro centro para seleccionar espermatozoides mediante GD que siguió tiempos de centrifugación cortos, a pocas revoluciones por minuto y a temperatura ambiente, sería un protocolo que no induciría daño en el ADN. Teniendo en cuenta que cuando procesábamos las muestras mediante GD+MACS teníamos un bajo porcentaje de recuperación de espermatozoides, pero que el 88.5% de ellos eran mótils y el 81.5% eran progresivos, podríamos decir que nuestro protocolo de GD es también, selectivo y eficiente ya que permite recuperar los mejores espermatozoides en cuanto a motilidad e integridad en el ADN.

Por otra parte, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, los estudios dirigidos a evaluar la relación entre la fragmentación en el ADN y el resultado de un ciclo de FIV deberían llevarse a cabo con los valores de fragmentación obtenidos en la muestra que va a ser utilizada para inseminar los ovocitos. Los resultados de los autores (Larson-Cook *et al.*, 2003; Bungum, 2004; Payne *et al.*, 2005) que analizan esta relación utilizando los valores de fragmentación obtenidos antes de procesar la muestra estarían condicionados por el método y el protocolo posterior de procesado. Este hecho

podría explicar las discrepancias entre los resultados obtenidos al valorar el efecto de la fragmentación en los resultados de las TRA.

5.2 FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO Y RESULTADOS CLÍNICOS DE CICLOS DE FIV.

Aunque es evidente que la integridad del ADN espermático es importante, existen evidencias que muestran que el ovocito es capaz de reparar el daño en el ADN endógeno y exógeno (Ashwood-Smith and Edwards, 1996). Este hecho puede ser uno de los motivos que dificultan el establecer un valor pronóstico del porcentaje de fragmentación del ADN espermático sobre las posibilidades de conseguir un embarazo tras someterse a un ciclo de FIV. A esta consideración hay que añadir la falta de consenso sobre qué técnica y qué protocolo son los más adecuados para analizar el grado de fragmentación. Además, los pocos estudios realizados con el objetivo de determinar el efecto de la fragmentación en los resultados de las TRA analizan una población escasa, aplican distintos diseños y las conclusiones que se obtienen entran en conflicto (Larson-Cook *et al.*, 2003; Bungum, 2004; Gandini, 2004; Henkel *et al.*, 2004; Payne *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2008; Avendaño *et al.*, 2010; Dar *et al.*, 2013; Simon *et al.*, 2013; Anifandis *et al.*, 2014).

La fragmentación de la muestra procesada para el ciclo de FIV era la correlacionada con los resultados del ciclo, a diferencia de otros trabajos publicados (Larson-Cook *et al.*, 2003; Bungum, 2004; Payne *et al.*, 2005). Tal como se discutió en el apartado anterior este aspecto es importante dado que la preparación de la muestra puede incrementar o disminuir la fragmentación del ADN en los espermatozoides. Por otra parte, valorar la fragmentación en la muestra que va a ser utilizada el día del procedimiento de FIV es básico teniendo en cuenta la gran variabilidad intra-individual descrita (Erenpreiss *et al.*, 2006), que podría ser debida a factores externos como la exposición temporal a tóxicos o simples episodios febriles (Evenson *et al.*, 1991; Evenson *et al.*, 2000; Bian *et al.*, 2004; Banks *et al.*, 2005; Aitken *et al.*, 2005; Hales *et al.*, 2005).

Otro aspecto novedoso a resaltar del estudio prospectivo realizado fue la valoración de los resultados obtenidos en ciclos de FIV realizados con ovocitos propios y con ovocitos donados. Era de esperar hallar una menor correlación entre la fragmentación en el ADN y los resultados de los ciclos que usaban ovocitos de donantes, ya que teóricamente tendrían más poder reparador, (Esbert *et al.*, 2009) sin

embargo no se observó efecto independientemente del origen de los ovocitos probablemente porque las pacientes que utilizaban sus propios ovocitos también eran jóvenes, ya que tenían una edad media de 35.3 años.

Los resultados globales obtenidos indicaron que la fragmentación en el ADN espermático no tenía efecto en la tasa de fecundación, en la probabilidad de obtener embriones transferibles ni en el porcentaje de gestación clínica. Sin embargo, la calidad embrionaria y la tasa de aborto aparecieron afectadas, aunque sin llegar a alcanzar significancia estadística.

Respecto a la tasa de gestación, no se observaron diferencias en el porcentaje de fragmentación entre mujeres que lograron un embarazo y las que no lo hicieron. Además, los resultados de las curvas ROC evidenciaron que la presencia de fragmentación en el ADN espermático no era suficiente para discriminar (como los test diagnósticos deben ofrecer) qué parejas iban a conseguir el embarazo de las que no lo iban a lograr. Nuestros resultados fueron coincidentes con los de otros autores (Bungum, 2004; Gandini *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2008) y pusieron de manifiesto que el desarrollo embrionario y la consecución del embarazo eran posibles con altos niveles de fragmentación en el ADN espermático. La falta de correlación entre ambas variables podría atribuirse a la capacidad reparadora del ovocito (Marchetti *et al.*, 2007; Aitken *et al.*, 2014) o a la selección embrionaria que realizan los embriólogos antes de la transferencia.

En nuestro estudio, aunque no llegó a presentar significancia estadística, se observó que el porcentaje de embriones de buena calidad era inversamente proporcional a la fragmentación del ADN espermático. Cabe mencionar que las transferencias se realizaron en D+3 de desarrollo, y somos conscientes que la posible influencia en la evolución embrionaria podría ser más evidente en los ciclos cuyas transferencias se realizaran en estadio de blastocisto. De hecho existen estudios que así lo demuestran (Ni *et al.*, 2014) y que describen una tasa de blastulación inferior cuando la fragmentación en el ADN espermático es alta.

Respecto a las tasas de aborto, nuestros resultados indicaron que un alto grado de fragmentación aparecía asociado con un alto riesgo de aborto, aunque sin llegar a la significancia, coincidiendo con lo publicado por otros autores (Carrell *et al.*, 2003; Virro *et al.*, 2004; Bungum, 2004; Check *et al.*, 2005). En nuestro estudio, la tasa de aborto de las pacientes que utilizaron sus propios ovocitos resultó del 16.67%, mientras que

las que usaron ovocitos de donante fue del 14.03%. Cuando el porcentaje de fragmentación del ADN fue $\geq 36\%$, la tasa de aborto se multiplicó por cinco en las pacientes que usaron sus propios ovocitos, y por cuatro en las pacientes que usaron ovocitos de donante en comparación con los casos donde el porcentaje era $< 36\%$. Estos datos, además de indicar que la fragmentación en el ADN incrementa la probabilidad de que se produzca un aborto clínico, indicarían que los ovocitos podrían perder capacidad reparadora del ADN con el paso del tiempo, de igual forma que la pierden otras células (Marchetti and Wyrobek, 2008; Oktay *et al.*, 2014).

Una de las limitaciones de este estudio fue el bajo número de embarazos y abortos que pudieron ser analizados. No obstante un meta-análisis reciente (Robinson *et al.*, 2014), que tenía por objetivo valorar el efecto de la fragmentación del ADN espermático en la tasa de aborto de 2969 parejas, apoyó nuestros resultados al describir un incremento significativo en la tasa de aborto en los pacientes con un mayor porcentaje de fragmentación en el ADN. Finalmente, cabe hacer referencia al estudio de Brahem (Brahem *et al.*, 2011) que observó que el porcentaje fragmentación espermática de pacientes con abortos recurrentes era el triple que el de un grupo control, formado por parejas que habían sido padres recientemente.

Una importante limitación para llegar a establecer la relación entre la fragmentación en el ADN espermático y la capacidad reproductiva es la falta de consenso respecto al valor que debe ser considerado como porcentaje límite de fragmentación. En un meta-análisis que incorporó 22 estudios relevantes (Collins *et al.*, 2008) no se consiguió definir el valor predictivo para la consecución de embarazo tras un tratamiento de FIV, y se concluyó que aun no existían evidencias para que el test de fragmentación fuera incluido en la rutina clínica de evaluación del varón estéril. Por otro lado, la falta de procedimientos estandarizados en los protocolos para cuantificar el daño en el ADN espermático hace muy difícil comparar los datos obtenidos en distintos laboratorios. Según un estudio publicado (Muratori *et al.*, 2010), pequeñas variaciones en el ensayo TUNEL, incluyendo la concentración de fijador, el tiempo de almacenamiento de las muestras fijadas, el tipo de fluorocromo usado para marcar las roturas en el ADN y el método usado para analizar los datos del citómetro de flujo podrían afectar las medidas de la fragmentación.

Establecer el efecto real de la fragmentación del ADN espermático será difícil hasta que la comunidad científica no se ponga de acuerdo en puntos cómo: qué muestra es la más adecuada para ser valorada (eyaculado o procesada; previa al ciclo

o utilizada en el ciclo, ...), cuál es la mejor técnica para medir la fragmentación, qué protocolos de los ensayos seguir y qué porcentaje limita la normalidad, que posiblemente diferirá según la técnica que la mida (Ribas-Maynou, 2013).

5.3 FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO, ANÁLISIS MEIÓTICO EN TEJIDO TESTICULAR Y DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOZOIDES

Según datos publicados, las anomalías en la meiosis podrían explicar la esterilidad en 6-8% de los pacientes (Egozcue *et al.*, 1983; De Braekeleer and Dao, 1991; Egozcue *et al.*, 2005), aunque en pacientes con OA podría aumentar hasta el 37.9% (Vendrell *et al.*, 1999). En nuestro estudio, que fue realizado con pacientes que presentaban fallos de ciclos previos o abortos de repetición, el porcentaje aumentó hasta el 71.7%. Según el estudio de Vendrell, la media de años de esterilidad era más elevada cuando el paciente presentaba una anomalía en la meiosis. En nuestro estudio, ésta media se situó en los 4.0 años, siendo el posible motivo de que encontráramos un porcentaje tan elevado de pacientes con anomalías meióticas. En cuanto a las anomalías cromosómicas en espermatozoides, otros autores también observaron un elevado porcentaje de espermatozoides aneuploides al analizar pacientes que han sufrido abortos previos y fallos de implantación tras ciclos de FIV llegando al 17.5% y 31.6% respectivamente (Rubio *et al.*, 2001). En nuestro grupo de estudio este porcentaje también resultó superior alcanzando el 46.7%, no obstante sería esperable teniendo en cuenta la alta proporción de pacientes con anomalías en la meiosis de nuestra población de estudio.

Al valorar la fragmentación en el ADN de los espermatozoides de estos pacientes, se observó que su porcentaje era independiente de los resultados del estudio meiótico o del estudio de FISH en espermatozoides. La fragmentación en el ADN espermático no fue predictora del resultado de la meiosis en BT ni de los resultados citogenéticos en espermatozoides, teniendo en cuenta el bajo valor obtenido del área bajo la curva ROC. Si la fragmentación hubiera tenido un valor pronóstico habría resultado de gran interés práctico, ya que se habría podido evitar una prueba quirúrgica a pacientes reticentes.

Existen pocos estudios publicados que relacionen el daño en el ADN espermático y las anomalías meióticas. Sin embargo en un trabajo reciente (Moskovtsev *et al.*, 2012), donde se analizaron 8 pacientes con un alto porcentaje de

fragmentación (>30%) pese estar siguiendo un tratamiento antioxidante, se describió una correlación significativa entre la alteración en la espermatogénesis y la integridad en la cromatina, una menor fragmentación en el ADN en los espermatozoides testiculares que en los eyaculados y un porcentaje superior de espermatozoides aneuploides a nivel testicular. Estos autores, concluyeron que en estos pacientes los espermatozoides eyaculados eran más adecuados para realizar ICSI ya que, aunque se observaba más fragmentación en el ADN, presentaban menos aneuploidías. El diseño experimental del estudio de Moskovtsev y el nuestro fue distinto. Dejando aparte que nosotros no analizamos la fragmentación en el ADN de los espermatozoides testiculares, ellos se centraron en pacientes con elevada fragmentación no originada por estrés oxidativo. Aunque nuestro grupo de estudio incluyó 7.5 veces más pacientes, éstos podían presentar fragmentación debido a cualquier motivo.

En un estudio realizado en 24 pacientes que sufrían AR (Carrell *et al.*, 2003) se observó, en primer lugar que la media del porcentaje de aneuploidías en los espermatozoides de los pacientes con AR era significativamente superior que el de un grupo control. Además el porcentaje de espermatozoides aneuploides se correlacionaba con el porcentaje de espermatozoides apoptóticos. Otro estudio realizado en 45 pacientes (Enciso *et al.*, 2013) observaba una correlación entre el porcentaje de fragmentación del ADN y el porcentaje de espermatozoides portadores de aneuploidías. Estos últimos apoyaban la teoría de que durante la espermatogénesis, los gametos anormales serían “marcados” para entrar en apoptosis. Sin embargo, algunos de ellos escaparían del proceso de muerte celular y se encontrarían en el eyaculado. Esta hipótesis se basó en los hallazgos que hicieron (Perrin *et al.*, 2012) al estudiar a 4 pacientes portadores de anomalías cromosómicas equilibradas. Observaron que la aneuploidía y la fragmentación estaban incrementadas en los espermatozoides de los portadores de anomalías cromosómicas y lo más importante, observaron distinta fragmentación en función de la segregación meiótica.

En una publicación realizada en 2012 (Bronet *et al.*, 2012) no se describe correlación entre la fragmentación en el ADN medida en la muestra procesada y el porcentaje de aneuploidías en los espermatozoides, ni tampoco con referencia a los embriones resultantes. Sin embargo, en este estudio se excluyeron los pacientes que tenían un elevado porcentaje de aneuploidías en los espermatozoides, y además observaron un incremento significativo del porcentaje de ADN fragmentado en la muestra procesada. Cabe considerar que su método de preparación del semen podría ser el responsable del incremento del daño en el ADN, con lo cual se habría podido

perder la relación al analizar las aneuploidías presentes en la muestra antes de procesar y la fragmentación en la muestra procesada. De igual manera, la relación entre la fragmentación en la muestra procesada y el porcentaje de embriones cromosómicamente anormales podría estar sesgada por el modo de preparación de la muestra de semen para realizar el ciclo.

Distintos motivos pueden haber hecho que en nuestro estudio no hayamos sido capaces de encontrar relación entre la fragmentación en el ADN y las anomalías cromosómicas a nivel testicular y en el eyaculado: en primer lugar, los resultados se analizaron categóricamente, separando los pacientes según si fueron diagnosticados como normales o anormales, mientras que en los trabajos mencionados se correlacionó el porcentaje de fragmentación con el de aneuploidías. Además, en el estudio de Carrell (Carrell *et al.*, 2003) y Enciso (Enciso *et al.*, 2013) la población analizada eran pacientes con AR, mientras que el nuestro también incluía pacientes con FI. Por otra parte, la fragmentación en el ADN puede ser originada por múltiples factores, no podemos descartar que en nuestro estudio tuviéramos pacientes con fragmentación en el ADN originada por distintas causas. Algunos autores postulan que la ansiedad puede provocar estrés oxidativo, los pacientes incluidos en nuestro estudio podían estar ansiosos frente a la BT que se sometían el día que entregaron la muestra de semen para el análisis de la fragmentación y del FISH (Bouayed *et al.*, 2009).

Está demostrado (Burrello *et al.*, 2003) que los espermatozoides aneuploides originan más embriones aneuploides, menor tasa de gestación y de implantación, e incrementa la tasa de aborto (38.9% en pacientes con un resultado de FISH en espermatozoides anormal vs. 11.1 en grupo control). Así mismo, meta-análisis recientes postulan que una mayor fragmentación en el ADN podría relacionarse con una mayor probabilidad de sufrir abortos (Robinson *et al.*, 2012).

A partir de nuestros datos no podemos concluir que exista una relación entre la fragmentación en el ADN, la aneuploidía en espermatozoides y el aborto. Algunos de los motivos que impedirían establecer una relación entre las tres variables serían el poco tamaño muestral de los estudios, que el aborto pueda ser de origen ovocitario o endometrial y que la fragmentación tenga varias causas.

5.4 PROCESADO DEL SEMEN MEDIANTE MACS®:

Aunque las consecuencias de la fragmentación del ADN espermático en los resultados de las TRA son controvertidas, su valoración se aplica de forma rutinaria en la mayoría de centros de RA y se está implementando la utilización de métodos de selección espermática dirigidos a reducir el número de espermatozoides con el ADN dañado.

Las columnas MACS han demostrado su efectividad disminuyendo el porcentaje de espermatozoides apoptóticos presentes en la muestra seminal (Grunewald *et al.*, 2001; Said *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010) y, según apunta un reciente meta-análisis, aumentando las tasas de gestación tras TRA (Gil *et al.*, 2013).

Uno de los principales objetivos de nuestro estudio fue comparar los parámetros seminales obtenidos en las distintas fracciones resultantes de procesar una muestra mediante GD+MACS®. Observamos que la concentración seminal disminuyó significativamente tras procesar la muestra, dato que también fue observado por otros autores (Said *et al.*, 2006), aunque sin llegar a la significancia estadística. Respecto a la motilidad de los espermatozoides recuperados tras los GD y MACS® observamos un incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides móviles, que pasó del 49.2% al 90.4%. Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores observamos estudios que describían un incremento menor de la motilidad que iba del 48.9% al 75.6% (De Vantéry Arrighi *et al.*, 2009) e incluso un estudio que observaba una disminución de la motilidad, yendo del 78.6% al 67.0% (Lee *et al.*, 2010). Basándonos en el hecho de que la tecnología MACS® debería retener los espermatozoides apoptóticos (que teóricamente presentan menor motilidad) el porcentaje de espermatozoides móviles que recuperamos con nuestro protocolo se ajustaría a lo esperado. Las discrepancias entre los resultados de distintos autores posiblemente se deban a los distintos protocolos que sigue cada grupo. De hecho, hay múltiples variantes en el uso de los MACS, como lo demuestra el artículo que postula que el paso por las columnas MACS debería hacerse antes de los GD porque de esta manera se recuperaría un porcentaje menor de espermatozoides apoptóticos (Tavalaee *et al.*, 2012).

En nuestro estudio también se valoró la relación entre los parámetros de la muestra y el porcentaje de espermatozoides totales retenidos en la columna MACS®. Nuestros resultados mostraron que a mayor porcentaje de espermatozoides

progresivos en la muestra antes de procesar, menor era el porcentaje de espermatozoides totales retenidos en la columna. Algunos autores han demostrado que uno de los primeros efectos de la inducción de la apoptosis es la reducción de la motilidad (Aitken and Baker, 2013), con lo cual, que nuestros resultados demuestren que el porcentaje de espermatozoides progresivos es inversamente proporcional al porcentaje de espermatozoides retenidos en la columna era de esperar.

Dado el interés clínico por la aplicación de los MACS, y el hecho de que como hemos visto previamente el número de espermatozoides se reduce tras el procesado, sería adecuado establecer el mínimo de espermatozoides que debe tener una muestra seminal para realizar la técnica sin disminuir las posibilidades de éxito de las TRA. Existen pocos datos que cuantifiquen el porcentaje de espermatozoides que se recuperan tras MACS®. Según nuestros resultados, el porcentaje de espermatozoides no recuperados tras aplicar GD+MACS fue del 98.5%, considerablemente diferentes del 24% que obtiene De Vantéry Arrighi (De Vantéry Arrighi *et al.*, 2009) y del 15% de Said (Said *et al.*, 2006).

La diferencias entre nuestro estudio y los otros dos fueron varias: en primer lugar el protocolo que seguimos para realizar GD incluyó una centrifugación de toda la muestra eyaculada, utilizó 3 capas de gradientes (45%, 70%, 95%) frente las 2 que usaron en los otros dos trabajos (45%; 90%); en nuestro caso tan sólo recuperamos el pellet que quedó tras los GD y ellos recuperaron toda la fracción. Además, en nuestro caso, los varones que se incluyeron en el estudio eran estériles que repetían un ciclo de ICSI pese a que la mitad de ellos eran normozoospermicos. La esterilidad idiopática que presentaban podría ser originada por múltiples factores, que también podrían influir en nuestro estudio.

Respecto al porcentaje medio de espermatozoides progresivos recuperado tras los GD este fue del 6.4%. Tras la aplicación de MACS®, el 32.7% quedó retenido en la columna, el 63.4% fue eluido y el 3.9% se perdió durante el procedimiento debido a la manipulación de la muestra. En resumen, recuperamos el 4.0% de los espermatozoides progresivos que teníamos de inicio.

Según el protocolo de nuestro centro, para conseguir óptimos resultados tras una IAH, un FIV convencional y un ICSI se requiere que tras los GD recuperemos 2, 0.4 y 0.2 Millones de espermatozoides progresivos totales. Sabiendo que el porcentaje de recuperación tras los GD y las columnas MACS® sería del 4.04%, estimamos que

estaría indicado realizar dicho procedimiento cuando partiéramos de una muestra con 75 Millones para una IAH, 50 Millones para una FIV convencional y 25 para un ICSI. Dado que cada centro tiene distintos criterios y porcentajes de recuperación espermática, sería necesario que cada laboratorio realizara sus propios cálculos para determinar el mínimo de espermatozoides que deberían tener las muestras a las cuales aplicar la técnica de MACS.

Habría sido interesante valorar la fragmentación del ADN espermático en cada fracción, sin embargo este estudio no se pudo llevar a cabo. No obstante, en un trabajo de nuestro equipo (Romany *et al.*, 2012) donde se abordó este tipo de análisis, se llegó a las siguientes conclusiones: tras *swim up* la fragmentación de los espermatozoides disminuía; la fragmentación de los espermatozoides retenidos en la columna y eluidos era igual.

Dado que algunos autores relacionan la fragmentación en el ADN del espermatozoide con las aneuploidías (Carrell *et al.*, 2003; Perrin *et al.*, 2012; Enciso *et al.*, 2013) y que las columnas MACS retendrían espermatozoides apoptóticos que finalizarían el proceso con la fragmentación en el ADN, valdría la pena ver si mediante los MACS podemos realizar una selección de los espermatozoides euploides. Un reciente estudio realizado sobre las muestras de 6 pacientes concluyó que mediante MACS se podría reducir la fragmentación en el ADN y la aneuploidía (Vendrell *et al.*, 2014). En este sentido, en la actualidad estamos llevando a cabo un estudio en el que analizamos el porcentaje de anomalías cromosómicas en los espermatozoides del eyaculado, en la parte retenida por MACS y la fracción eluida. Los resultados preliminares obtenidos a partir de las muestras de 11 pacientes, evidencian que en la parte retenida observamos un mayor número de espermatozoides con dotación cromosómica anormal.

5.5 COLUMNAS MACS Y ACORTAMIENTO DE LA ABSTINENCIA SEXUAL COMO HERRAMIENTAS PARA DISMINUIR LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO:

La mayoría de estudios muestran que existe una relación directa entre los días de abstinencia sexual y los parámetros seminales. Poca abstinencia se ha relacionado con un menor volumen seminal y una baja concentración espermática (Van Duijn *et al.*,

1971; Carlsen *et al.*, 2004). No obstante, algunos autores afirman que tras un día de abstinencia obtenemos un pico con mejor motilidad y morfología (Levitas *et al.*, 2005).

La relación entre abstinencia y fragmentación en el ADN también ha sido puesta en evidencia (Cohen-Bacrie *et al.*, 2009; Gosálvez *et al.*, 2011). El motivo por el cual las muestras obtenidas tras pocos días de abstinencia presentarían una menor fragmentación sería el menor tiempo de paso por el epidídimo y por lo tanto la menor exposición de los espermatozoides a los ROS (Greening, 2007). Por estos motivos, se suele exigir entre 3 y 5 días de abstinencia a los pacientes que se someten a TRA, pese a no existir ninguna evidencia científica clara que justifique que este periodo sea el óptimo para conseguir un embarazo.

En nuestro estudio, se observó una menor fragmentación en la muestra tras 1 día de abstinencia que en el eyaculado y la muestra procesada tras 5 días de abstinencia. Sin embargo, coincidiendo con otros autores (Van Duijn and Freund, 1971), se observó una disminución en el volumen seminal y el número total de espermatozoides eyaculados cuando la muestra se obtuvo tras un día de abstinencia.

En el caso de que la muestra seminal tuviera que ser utilizada para realizar una TRA, la disminución en el número de espermatozoides podría tener un efecto negativo si se tuvieran que someter a una IAH, pero poco trascendente si se sometieran a un ciclo de ICSI, donde se requieren pocos espermatozoides. Si se sometieran a un procedimiento de FIV convencional habría que valorar que sería lo más conveniente, si aplicar MACS® o reducir la abstinencia.

Varios autores han analizado el efecto de la abstinencia en la fragmentación del ADN espermático, aunque con diseños experimentales distintos al de nuestro estudio. En una publicación se describe una correlación entre ambas variables en un estudio que evaluaba 1633 muestras seminales de pacientes (Cohen-Bacrie *et al.*, 2009). En nuestro estudio, el mismo individuo donaba la muestra de semen bajo dos condiciones con lo que consideramos que la variabilidad individual estuvo mejor controlada. En otro estudio (Pons *et al.*, 2013) se pidió a los pacientes que entregaran una muestra de semen tras un periodo de entre 3 y 7 días de abstinencia. Si las muestras presentaban 30% o más de fragmentación, entregaban posteriormente otra muestra de semen tras sólo 1 día de abstinencia y los autores observaron que en el 91.4% de los casos la fragmentación disminuía. En nuestro estudio, obteniendo ambas muestras con 5 días

de diferencia, se pretendía que los factores externos que podían alterar la fragmentación en el ADN (Aitken *et al.*, 2014) tuvieran el mínimo impacto.

Por otra parte, la población analizada en nuestro estudio estaba formada por individuos sin problemas de esterilidad, cuyo diagnóstico seminal era mayoritariamente de normozoospermia ya que se optó por analizar una población en la que el factor de esterilidad no condicionara los resultados. Cabría esperar que en el caso de haber incluido varones estériles, con oligozoospermia o astenozoospermia, el resultado fuera distinto, dado que múltiples estudios demuestran que la fragmentación en el ADN es mayor en estos individuos (Irvine *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2002; Cohen-Bacrie *et al.*, 2009; Brahem *et al.*, 2011). Comparar los resultados obtenidos reduciendo la abstinencia y los obtenidos tras MACS en muestras patológicas es un estudio derivado este trabajo que está en proceso. Por otra parte, el efecto conjunto de la utilización de GD y MACS® con sólo 1 día de abstinencia también está en vías de estudio ya que esta estrategia podría ser especialmente efectiva.

Tal como se ha descrito anteriormente, cuando procesamos una muestra seminal mediante GD+MACS® el total de espermatozoides se reduce, aunque la motilidad aumenta. Obteniendo la muestra tras un día de abstinencia, la concentración espermática de partida ya sería menor, con lo cual habría que valorar qué estrategia seguir en función de los parámetros seminales del paciente y de la TRA a la que se tuviera que someter. En el caso de muestras con elevada fragmentación donde la concentración espermática no fuera un factor limitante, se podría evitar la sobremanipulación que origina los MACS® entregando la muestra tras un día de abstinencia.

6 CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1) El procesado de las muestras seminales mediante gradientes de densidad disminuye la fragmentación observada en el ADN espermático respecto la presente en las muestras de eyaculado sin procesar
- 2) Tras un ciclo de FIV con ovocitos propios o donados, el porcentaje de fecundación, de embriones con buena calidad por cohorte, de embarazo y de implantación es independiente de la fragmentación del ADN espermático de la muestra seminal con el que se inseminan los ovocitos. El efecto de la fragmentación en el ADN espermático sobre las tasas de aborto requiere un análisis más exhaustivo.
- 3) La fragmentación en el ADN espermático no se correlaciona con la presencia de anomalías meióticas ni de anomalías cromosómicas en espermatozoides.
- 4) El procesado mediante gradientes de densidad y MACS[®] da lugar a fracciones con mejor movilidad y menor presencia de espermatozoides apoptóticos, aunque disminuye en el número de espermatozoides recuperados.
- 5) Acortando la abstinencia sexual se consigue una reducción de la fragmentación en ADN espermático equivalente a la obtenida mediante gradientes de densidad y columnas MACS[®], sin embargo el volumen seminal y el número total de espermatozoides disminuye.

7 BIBLIOGRAFÍA

A

- Abad C, Amengual MJ, Gosálvez J, Coward K, Hannaoui N, Benet J, García-Peiró A, Prats J. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrologia*. 2013; 3: 211-216.
- Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004;
- Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology* 2009
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41: 183-197.
- Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, Wiklendt AM, King BV. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl* 2005; 28: 171-179.
- Aitken RJ, Curry BJ. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal* 2011; 1: 367-381.
- Aitken RJ, Baker MA. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol* 2013; 57: 265-272.
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 2014; 16: 31-38.
- Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif* 1992; 3: 241-250.
- Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 334-346.
- Amiri I, Ghorbani M, Heshmati S. Comparison of the DNA Fragmentation and the Sperm Parameters after Processing by the Density Gradient and the Swim up Methods. *J Clin Diagn Res* 2012; 6: 1451-1453
- Anifandis G, Bounartzi T, Messini CI, Dafopoulos K, Markandona R, Sotiriou S, Tzavella A, Messinis IE. Sperm DNA fragmentation measured by Halosperm does not impact on embryo quality and ongoing pregnancy rates in IVF/ICSI treatments. *Andrologia* 2014; n° in press.
- Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A., Platts AE, Saida M, Steger K, Tedder P, Miller D. Endonuclease-sensitive regions of human

spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* 2009; 19: 1338–1349.

Ashwood-Smith MJ, Edwards RG. DNA repair by oocytes. *Hum. Reprod* 1996; 2: 46–51.

Avendaño C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil. Steril* 2010; 94: 549–557.

Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril* 2004; 2: 349-354.

B

Bajo Arenas JM, Coroleu Lletget B. *Fundamentos de reproducción* 2009. Ed. Médica Panamericana

Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005; 129: 505-514.

Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, De Mouzon J, Hazout A, Ménézo Y. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 392-397.

Bian Q, Xu LC, Wang SL, Xia YK, Tan LF, Chen JF, Song L, Chang HC, Wang XR. Study on the relation between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occup Environ Med* 2004; 61: 999-1005.

Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996; 11: 722–726.

Boaz SM, Dominguez K, Shaman JA, Ward WS. Boaz S Mouse spermatozoa contain a nuclease that is activated by pretreatment with EGTA and subsequent calcium incubation. *J Cell Biochem* 2008; 103: 1636-1645.

Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 17: CD004507

Bouayed J, Rammal HM, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: Relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2: 63–67.

Brahem S, Mehdi M, Landolsi H, Mougou S, Elghezal H, Saad A. Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology* 2011; 4: 792-796.

Bronet F, Martínez E, Gaytán M, Liñán A, Cernuda D, Ariza M, Nogales M, Pacheco A, San Celestino M, Garcia-Velasco JA. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Hum Reprod* 2012; 7: 1922-1929.

Bungum M. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum. Reprod* 2004; 19: 1401–1408.

Burrello N, Vicari E, Shin P, Agarwal A, De Palma A, Grazioso C, D'Agata R, Calogero AE. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Human Reproduction* 2003; 7: 1371-1376.

C

Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril* 2004; 2: 358-366.

Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch DW, Hatasaka HH Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet. Gynecol* 2003; 101: 1229-1235.

Check JH, Graziano V, Cohen R, Krotec J, Check ML. Effect of an abnormal sperm chromatin structural assay (SCSA) on pregnancy outcome following (IVF) with ICSI in previous IVF failures. *Arch. Androl* 2005; 51: 212-214.

Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménéz YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil. Steril* 2009, 91: 1801-1805.

Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008; 89: 823-831.

D

Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril* 2004; 82: 1443-1445.

Dar S, Grover SA, Moskovtsev SI, Swanson S, Baratz A, Librach CL. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with a markedly high DNA fragmentation index (>50%). *Fertil Steril* 2013; 1: 75-80.

Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 1995; 7: 131-135.

De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum. Reprod* 1991; 2: 245-250.

De Iulius GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009; 81: 517-524.

De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril* 2004; 82: 57-65.

De La Rochebrochard E., De Mouzon J, Thépot F, Thonneau P. Fathers over 40 and increased failure to conceive: the lessons of in vitro fertilization in France. *Fertil Steril* 2006; 85: 1420-1424.

De Vantéry Arrighi C, Lucas H, Chardonnens D, De Agostini A. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human

assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 1-12.

Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum. Reprod* 2002; 17: 3122-3128.

E

Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S. Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 1983; 2: 185-188.

Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, Navarro J, Benet J, Vidal F. Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 337-342.

Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL, Gosálvez J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2009; 5: 609-616.

Enciso M, Alfarawati S, Wells D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod* 2013; 6: 1707-1715.

Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod* 2004; 19: 2277-2282.

Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbindans J, Giwercman A. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum. Reprod* 2006; 21: 2061-2064.

Esbert, M., Florensa, M., Riqueros, M., Martin, M., Ballesteros, A., Calderon, G. «Can the oocyte repair male age effects? Analysis of 2454 IVF cycle outcomes.» *Fertility and Sterility* 2009; 3: 146.

Evans EP, Breckon G, Ford CE. An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 1964; 3: 289-294.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131-1133.

Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol* 1991; 5: 115-125.

Evenson DP, José LK, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 2000; 5: 739-746.

Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparison with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25-43.

Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol Biol* 2013; 927: 147-164.

F

- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24: 59-66.
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2005; 84: 860.
- Ford WC, North K, Taylor H, Farrow A, Hull MG, Golding J. Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPAC Study Team (Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood). *Hum Reprod* 2000; 15:1703-1708.
- Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 1996; 13: 199-203.

G

- Gandini L. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum. Reprod* 2004; 19: 1409-1417.
- García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Jones C, Coward K, Gosálvez J, Benet J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril* 2011; 1: 105-109.
- García-Peiró A, Ribas-Maynou J, Oliver-Bonet M, Navarro J, Checa MA, Nikolaou A, Amengual MJ, Abad C, Benet J. Multiple determinations of sperm DNA fragmentation show that varicocele is not indicated for infertile patients with subclinical varicocele. *Biomed Res Int.* 2014. 181396
- Garrido N., Zuzuarregui JL, Meseguer M, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Sperm and oocyte donor selection and management: experience of a 10 year follow-up of more than 2100 candidates. *Hum Reprod* 2002; 17: 3142–3148.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987; 236: 962-964.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Schmid CW, Bradbury EM. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem* 1990; 265: 20662-20666.
- Gil M, Sar-Shalom V, Melendez Sivira Y, Carreras R, Checa MA. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30: 479-485.
- Gomez E, Buckingham DW., Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1996; 3: 276-287.

- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; 8: 1945-1951.
- Gorelick JI and M. Goldstein, Loss of fertility in men with *varicocele*. *Fertility and Sterility* 1993; 3:613–616
- Gosalvez J, González-Martínez M, López-Fernández C, Fernández JL, Sánchez-Martín P. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril* 2011; 5: 1083-1086.
- Gottlieb RA. Mitochondria and apoptosis. *Biol Signals Recept* 2001; 3-4: 147-161.
- Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the Incidence of Sperm DNA Fragmentation by Oral Antioxidant Treatment. *Journal of Andrology* 2005; 26: 349-353.
- Greening DJ. Frequent ejaculation. A pilot study of changes in sperm DNA damage and semen parameters using daily ejaculation. *Fertil. Steril* 2007, 88: S19–S20.
- Grunewald S., Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001; 3: 127-133.

H

- Hales BF, Barton TS, Robaire B. Impact of paternal exposure to chemotherapy on offspring in the rat. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 34: 28-31.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009; 460: 473-478.
- Henkel R, Hajimohammad M, Staf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill W, Kruger TF. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81: 965-972.
- Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil. Steril* 2005; 84: 130–140.
- Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 1347–1354.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 613-619.

I

- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33–44.

J

Jayaraman V, Upadhyaya D, Narayan PK, Adiga SK. The sperm processing by swim-up and density gradient is effective in the elimination of the sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 557-563.

K

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 4: 239-257.

Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001; 75: 237-248.

Kopecný V, Pavlok A. Autoradiographic study of mouse spermatozoan arginine-rich nuclear protein in fertilization. *J Exp Zool* 1975; 1: 85-96.

L

Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995; 10:15-21.

Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperon KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003; 80: 895-902.

Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997; 5: 2081-2088.

Lee TH, Liu CH, Shih YT, Tsao HM, Huang CC, Chen HH, Lee MS. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod* 2010; 4: 839-846.

Levitas E, Lunenfeld E, Weiss N, Friger M, Har-Vardi I., Koifman A., Potashnik G. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. *Fertil Steril* 2005; 6: 1680-1686.

Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Potashnik G. Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: analysis of 6022 semen samples. *Andrologia* 2007; 39: 45-50.

Li Z, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2006; 23: 367-376.

Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008; 69: 352-359.

Liu DY, Liu ML. Clinical value of sperm DNA damage should be assessed in motile sperm fraction rather than whole ejaculated sperm. *Fertil Steril* 2013; 99: 367-371.

Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. *Asian J Androl* 2011; 13: 690-697.

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril* 1998; 69: 528-532.

M

Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 17725-17729.

Marchetti F, Wyrobek AJ. DNA repair decline during mouse spermiogenesis results in the accumulation of heritable DNA damage. *DNA Repair* 2008; 7: 572-581.

McPherson SM, Longo FJ. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 268-279.

Ménézo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clément P, Benkhalifa M. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 418-421.

Migliore L, Naccarati A, Zanello A, Scarpato R, Bramanti L, Mariani M. Assessment of sperm DNA integrity in workers exposed to styrene. *Hum Reprod* 2002; 17: 2912-2918.

Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010; 2: 287-301.

Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 2: 231-238.

Molday RS, Yen SP, Rembaum A. Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells. *Nature* 1977; 5619: 437-438.

Moskovtsev SI, Alladin N, Lo KC, Jarvi K, Mullen JB, Librach CL. A comparison of ejaculated and testicular spermatozoa aneuploidy rates in patients with high sperm DNA damage. *Syst Biol Reprod Med* 2012; 3: 142-8.

Muratori M, Tamburrino L, Tocci V, Costantino A, Marchiani S, Giachini C, Laface I, Krausz C, Meriggol MC, Forti G, Baldi E. Small variations in crucial steps of TUNEL assay coupled to flow cytometry greatly affect measures of sperm DNA fragmentation. *J. Androl* 2010; 31: 336-345.

Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, De los Santos MJ, Meseguer M. 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. *Fertil Steril* 2006; 2: 371-383.

N

- Nanassy L, Liu L, Griffin J, Carrell DT. The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein Pept Lett* 2011; 8: 772-777.
- Nadjarzadeh A, Shidfar F, Amirjannati N, Vafa MR, Motevalian SA, Gohari MR, Nazeri Kakhki SA, Akhondi MM, Sadeghi MR. Effect of Coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial. *Andrologia* 2014; 46: 177-183.
- Ng KK, Donat R, Chan L, Lalak A, Di Pierro I, Handelsman DJ. Sperm output of older men. *Hum Reprod* 2004; 19: 1811-5.
- Ni W, Xiao S, Qiu X, Jin J, Pan C, Li Y, Fei Q, Yang X, Zhang L, Huang X. Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcome of frozen-thawed embryo transfer and on blastocyst formation. *PLoS One* 2014; 9: e94956.

O

- Oh E, Lee E, Im H, Kang HS, Jung WW, Won NH, Kim EM, Sul D. Evaluation of immuno- and reproductive toxicities and association between immunotoxicological and genotoxicological parameters in waste incineration workers. *Toxicology* 2005; 15: 65-80.
- Oktay K, Moy F, Titus S, Stobezki R, Turan V, Dickler M, Goswami S. Age-related decline in DNA repair function explains diminished ovarian reserve, earlier menopause, and possible oocyte vulnerability to chemotherapy in women with BRCA mutations. *J Clin Oncol* 2014; 32: 1093-1094.
- Oldereid NB, Gordeladze JO, Kirkhus, B, Purvis K. Human sperm characteristics during frequent ejaculation.» *J Reprod Fertil* 1984; 71: 135-140.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 291-298.

P

- Payne JF, Raburn DJ, Couchman, GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil. Steril* 2005; 84: 356-364.
- Perrin A, Basinko A, Douet-Guilbert N, Gueganic N, Le Bris MJ, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality. *Cytogenet Genome Res* 2012; 58: 142-148.
- Pons I, Cercas R, Villas C, Braña C, Fernández-Shaw S. One abstinence day decreases sperm DNA fragmentation in 90 % of selected patients. *J Assist Reprod Genet* 2013; 9: 1211-1218.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. «The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril* 2013; 3: 673-677.

R

- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Amengual MJ, Prada E, Cortés P, Navarro J, Benet J. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* 2012; 9:e44679.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, Navarro J, Benet J. 1. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013; 5: 715-22.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Nuclear degraded sperm subpopulation is affected by poor chromatin compaction and nuclease activity. *Andrologia* 2014; 10: 1-9
- Rivero MT, Vázquez-Gundín F, Muriel L., Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Patterns of DNA migration in two-dimensional single-cell gel electrophoresis analyzed by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Environ Mol Mutagen* 2003; 3: 223-227.
- Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012; 27: 2908-2917.
- Romany L, Garrido N, Fernandez JL, Pellicer A, Meseguer M. Assisted reproduction results improvements due to magnetic activated cell sorting (MACS) depletion of apoptotic sperm is not mediated by sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2012; 27: 121.
- Rouen A, Pyram K, Pollet-Villard X, Hyon C, Dorna M, Marques S, Chantot-Bastaraud S, Joyé N, Cassuto NG, Siffroi JP. Simultaneous cell by cell study of both DNA fragmentation and chromosomal segregation in spermatozoa from chromosomal rearrangement carriers. *J Assist Reprod Genet* 2013; 3: 383-390.
- Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, Remohí J, Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 10: 2084-2092.

S

- Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Glander HJ, Paasch U. Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online* 2006; 3: 336-339.
- Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 2: 350-355.
- Sakkas, D., Manicardi, G.C., Tomlinson, M., Mandrioli, M., Bizzaro, D. «The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate the spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies.» *Hum Reprod* 2000; 15: 1112–1126.

- Saleh RA, Agarwal A, Nelso DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ Jr., Sharma RK. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril* 2002; 78: 313–318.
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertility and Sterility* 2003; 6: 1431–1436
- Sánchez-Martín P, Sánchez-Martín F, González-Martínez M, Gosálvez J. Increased pregnancy after reduced male abstinence. *Syst Biol Reprod Med* 2013; 59: 256-260.
- Sarrate Z, Anton E. Fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm. *J Vis Exp* 2009; 31: 1405.
- Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek AJ. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod* 2007; 22: 180-187.
- Schmid TE, Eskenazi B, Marchetti F, Young S, Weldon RH, Baumgartner A, Anderson D, Wyrobe AJ. Micronutrients intake is associated with improved sperm DNA quality in older men. *Fertil Steril* 2012; 5: 1130-1137.
- Selivanova G, Wiman KG. p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv Cancer Res* 1995; 66: 143-180.
- Sergerie M, Laforest G., Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum. Reprod* 2005; 20: 3446-3451.
- Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS. The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J Cell Biochem* 2007a; 102: 680–688.
- Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS. Function of the sperm nuclear matrix. *Arch Androl* 2007b; 53: 135-140.
- Silver EW,, Eskenazi B, Evenson DP, Block G, Young S, Wyrobek AJ. Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *J Androl* 2005; 4: 550-556.
- Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, Lewis SE. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 2013; 26: 68-78.
- Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD, Schneider EL. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res* 1989; 184: 461-470.
- Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80: 1420-1430.
- Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF, Veldhoven JL, Weber RF, Dohle GR. Decreased sperm DNA fragmentation after surgical varicocelectomy is associated with increased pregnancy rate. *J Urol.* 2013; 189. S146-50
- Sotolongo B, Lino E, Ward WS. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod* 2003; 26: 272–280.

Sotolongo B, Huang TT, Isenberger E, Ward WS. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl* 2005; 26: 272-280.

Spanò M, Kolstad AH, Larsen SB, Cordelli E, Leter G, Giwercman A, Bonde JP. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Hum Reprod* 1998; 9: 2495-2505.

Spanò M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Nuclear chromatin variations in the human spermatozoa which underwent swim-up and cryopreservation, which were evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 29-37.

T

Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2009; 4: 1119-1126.

Tavalaee M, Deemeh MR, Arbabian M, Nasr-Esfahani MH. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 2012; 1: 31-38.

Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, Beebe SJ. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod* 2004; 11: 825-834.

Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasemzadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia* 2008; 4: 245-251.

Thomson LK, Zieschang JA, Clark AM. Oxidative deoxyribonucleic acid damage in sperm has a negative impact on clinical pregnancy rate in intrauterine insemination but not intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2011; 96: 843-847.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.

Tunc O, Thompson J. Tremellen Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reprod Biomed Online* 2009; 6: 761-768.

Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 439-445.

V

Valverde M, Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat Res* 2009; 1: 93-109.

Van der Heijden GW, Ramos L, Baart EB, Van den Berg IM, Derijck AA, Van der Vlag J, Martini E, De Boer P. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* 2008; 8: 34.

Van Duijn C, Freund M. The relationship between some seminal characteristics and ejaculation frequency in the human male. *Eur J Obstet Gynecol* 1971; 5: 167-174.

Bibliografía

Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31: 1-9.

Vendrell JM, García F, Veiga A, Calderón G, Egozcue S, Egozcue J, Barri PN. Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14: 375-378.

Vendrell X, Ferrer M, García-Mengual E, Muñoz P, Triviño JC, Calatayud C, Rawe VY, Ruiz-Jorro M. Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reprod Biomed Online* 2014; 4: 492-502.

Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004; 5: 1289–1295.

W

Ward WS, Partin AW, Coffey DS. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 1989; 98: 153–159.

Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 569-574.

Ward WS, Kimura Y, Yanagimachi R. An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. *Biol Reprod* 1999; 60: 702–706.

Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 30-36.

World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2010. *Fifth edition*. Cambridge: Cambridge University Press.

Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 2003; 278: 29471–29477.

Y

Yamauchi Y, Shaman JA, Ward WS. Topoisomerase II mediated breaks in spermatozoa cause the specific degradation of paternal DNA in fertilized oocytes. *Biol Reprod* 2007; 76: 666–672.

Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS. Asynchronous DNA replication and origin licensing in the mouse one cell embryo. *J Cell Biochem* 2009; 107: 214–223.

Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1950–1953.

Z

Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 122-131.

- Zhang LH, Qiu Y, Wang KH, Wang Q, Tao G, Wang LG. Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick-end labeling assay. *Fertil Steril* 2010; **94**: 1027-1032.
- Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer RR, Boissonneault G, Yanagimachi R, Meistrich ML. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 2004; **38**: 200-213.
- Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod* 2008; **23**: 2663-2668.
- Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum. Reprod* 2005; **20**: 3476-3480.

8 GLOSARIO

%fADNe- porcentaje de fragmentación en el ADN espermático

4HNE- *4-Hydroxynonenal*

AIF- *apoptosis inducing factor*

ANOVA- *analysis of variance*

APE1- *apurinic/aprimidic (AP) endonuclease*

AR- abortos de repetición

Bax- *Bcl-2 associated X protein*

Bcl-2- *B-cell lymphoma 2*

BER- *base excision repair*

BT- biopsia testicular

CAD- *caspase-activated DNase*

Cy3- citocromo 3

DAPI- *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DE- desviación estandar

DFI- *DNA fragmentation index*

ET- embriones transferidos

Fas L- Fas ligando

FISH- fluorescence in situ hybridization

FITC- *fluorescein isothiocyanate*

FSH- hormona foliculoestimulante

GD- gradientes de densidad

GnRH- hormona liberadora de gonadotropina

HCG- gonadotropina coriónica humana

HDS- *high DNA stainability*

hMG- gonadotropina menopáusica humana

HOX- *homeobox*

HTF- human tubaric fluid

IAH- inseminación artificial homóloga

IC- intervalo de confianza

ICSI- *intracytoplasmic sperm injection*

IVI- instituto valenciano de infertilidad

MACS- *magnetic activated cell separation*

MARS- *matrix attachment regions*

OGG1- *8-oxoguanine glycosylase 1*

PARP- *poly-ADPribose*

PBS- *phosphate buffered saline*

PFA- paraformaldehído

PS- fosfatidilserina

PUFA- *polyunsaturated fatty acids*

RNS- *reactive nitrogen species*

ROC- *receiver operating characteristics*

ROS- *reactive oxygen species*

SCGE- *single cell gel electrophoresis*

SCSA- *sperm chromatin structure assay*

SDC- sperm chromatin dispersion test

SMG- seminograma

SPSS- *statistical package for the social sciences*

TdT- enzima transferasa terminal

TOP2B- topoisomerasa 2 beta

TRA- técnicas de reproducción asistida

TUNEL- *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated diogexigenin-dUTP
nick-end labelling*

9 AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

-A mi equipo (o “epipo” según Teo): Nardi, Teo y Pol ¡Gracias por hacerme tan feliz! Us estimo molt

-A los que me enseñaron que todo es posible con tenacidad y esfuerzo: mis padres y resto de familia

-A las que lo hicieron posible: Fanny Vidal y Gloria Calderón

-A los que siempre estuvieron para echar una mano (y unas risas): Alberto Pacheco y David Amorós

-A los que me alentaron: Nicolás Garrido, Nicolás Prados, Lorena Rodríguez y Marcos Meseguer

-A los que me ayudaron a empezar: Anna Veiga (y compañeros de la Dexeus), Macarena García-Otero (y compañeros de CIVTE), Francisco Bedoya, Valerie Vernaev y Juan Alvarez

-A mis compañeros del IVI, por permitirme hacer todos los estudios que he propuesto y colaborar en su realización: Agustín Ballesteros, Josep M^a Pomerol, chicas de andrología (Jenifer Rico, Vero Parra, Nuria Mendez, Sandra Morlans, Esther Rico, Mireia Gonzalez y Eva Vilchez), ginecólogos, enfermeras, departamento internacional, secretarias, informática, mantenimiento...

-A mis compañeros del laboratorio de FIV, que randomizaron casos, fijaron muestras en fin de semana, entregaron consentimientos a pacientes, leyeron mis abstracts, aguantaron charlas de ensayo e incluso participaron en mis estudios: Mireia Florensa, Marissa Riqueros, Jose Molina, Marta Belles, Marta Martín, Ivette Vanrell, Jose Teruel, Javi Herreros (¡sombri! con trombos, pero contenta), Carles Llop, Eloi Palmeiro, Nuno Borges, Mariona Quera, Miriam Jimenez, Vero Mon y demás

-A las que me echaron un cable con la estadística: Eurídice Martínez y Patricia Santagueda

-Al que me ayudó con la bibliografía: Jose Bartret

-A la que siempre respondió cuando tenía una duda sobre meiosis: Susanna Egozcue

Agradecimientos

-A mis primeros profesores de andrología: Josep M^a Vendrell y Ferran Garcia.

-A la gente del departamento de bioquímica médica y biología molecular e inmunología de la facultad de Medicina de la universidad de Sevilla. Por abrirme sus puertas (y a mi bici, también) y enseñarme tantas cosas. Explicarme cómo a hacer “cometas” durante las tardes de feria no tiene precio.

-A mi pilar: Noe, Alex, Sandra, Elsa y Elena

-Al que, sin saberlo, me retó: Pablo Marina

-A la buena gente que me rodea y hace que mi vida sea más feliz: “Balmes 77”, “Mares Parc” y resto de amigos