

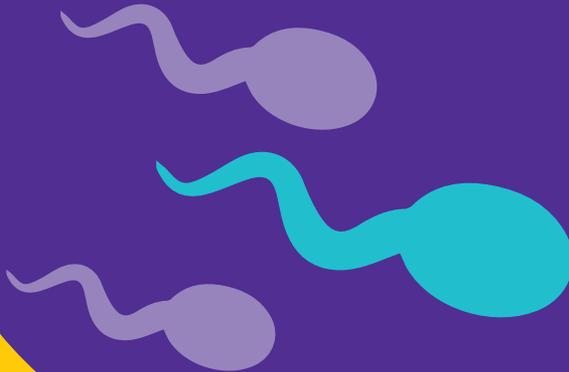


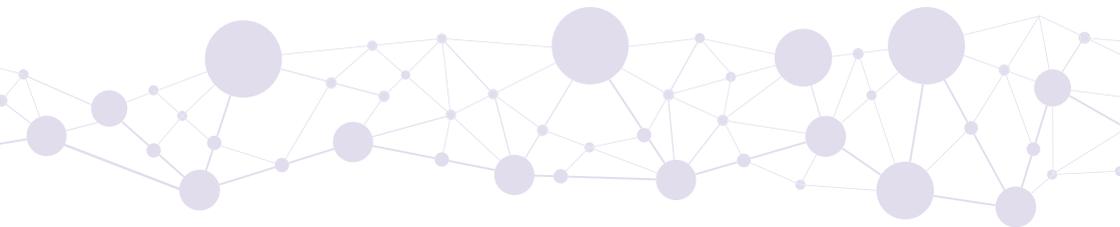
MANUAL DE ESTUDIO SEMINAL

Dra. Rocío Núñez Calonge
Dra. Ana Segura Paños



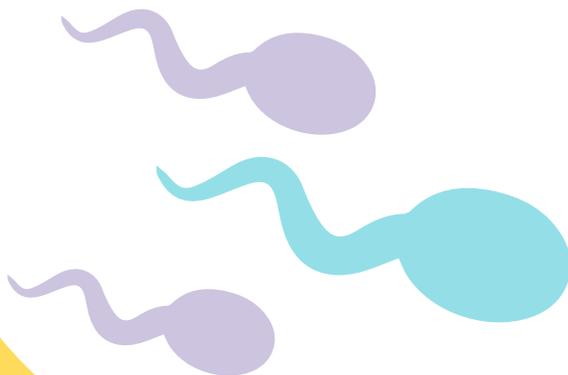
para
profesionales
de reproducción
asistida

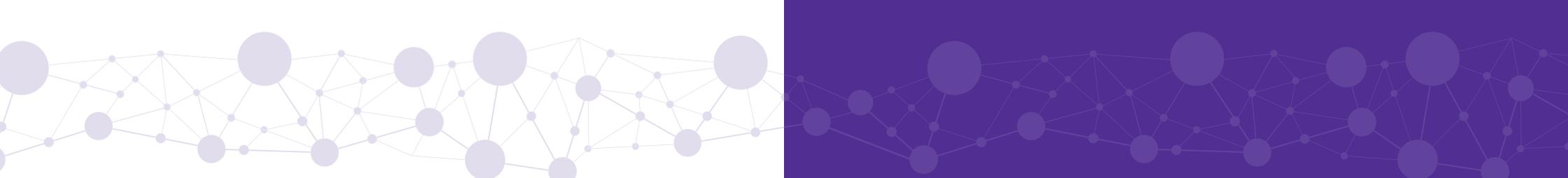




MANUAL DE ESTUDIO SEMINAL

**para
profesionales
de reproducción
asistida**





AUTORAS

Dra. Rocío Núñez Calonge

Especialista en Reproducción Humana.

Embrióloga senior de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y embriología (ESHRE).

Coordinadora científica en Grupo Internacional de Reproducción (URA).

Dra. Ana Segura Paños

Especialista en Andrología Clínica por el Servicio de Andrología de la Fundación Puigvert-IUNA en Barcelona y por la Academia Europea de Andrología y titulación de Fellow of the European Committee of Sexual Medicine (FECSM).

Responsable de la Unidad de Andrología (Servicio de Urología) del Hospital General Universitario de Alicante.

Responsable de la Sección de Andrología de la Unidad de Reproducción-Clinica HLA- Vistahermosa de Alicante.

Título: Manual de estudio seminal para profesionales de reproducción asistida

© Copyright textos: Autores

© Copyright Edición 2022: Merck S.L.U.

ISBN: 978-84-18568-79-4

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida ni transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo las fotocopias o las grabaciones en cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información, sin el permiso escrito de los titulares del copyright y de los titulares de los derechos patrimoniales y morales de la obra, entendiéndose ésta como los textos y material gráfico soporte de los textos.

“Esta obra se presenta como un servicio a la profesión médica. El contenido de la misma refleja las opiniones, criterios, conclusiones y/o hallazgos propios de sus autores, los cuales pueden no coincidir necesariamente con Merck S.L.U., divulgador y titular de la obra”.

Edita: Canal Estrategia Editorial S.L.
Avda. Europa 16, chalet 13
28224 Pozuelo de Alarcón, Madrid



SUMARIO

Introducción	7
1. El varón en la consulta de esterilidad: ¿qué hay que pedir inicialmente?	9
1.1. Estudio básico seminal	9
1.2. Cuestionario necesario en el análisis de semen	11
1.3. ¿Cómo pueden interferir en los resultados estos datos?	11
2. Interpretación del análisis básico de semen	13
2.1. Análisis macroscópico	13
2.2. Azoospermia y oligozoospermia severa	16
2.3. Astenozoospermia severa	19
2.4. Teratozoospermia severa	21
3. ¿Cuándo es necesario y cómo pedir un cultivo de semen?	23
3.1. ¿Por qué pedir un cultivo de semen?	23
3.2. ¿Cuándo y cómo solicitar el cultivo de semen?	25
4. Recuperación de espermatozoides móviles	27
4.1. ¿Por qué es importante solicitar un REM?	27
4.2. ¿Qué es interesante conocer del REM?	28
5. Eyacuación retrógrada	31
5.1. ¿Cómo diagnosticar la eyacuación retrógrada?	31
5.2. ¿Cómo recuperar los espermatozoides de la orina?	32

6. Otras técnicas diagnósticas	33
6.1. ¿Por qué son necesarias otras pruebas?	34
6.2. Pruebas genéticas:	34
• FISH (fluorescence in situ hybridization) en espermatozoides.....	34
• Estudio de las microdeleciones del cromosoma Y	35
6.3. Integridad del ADN.....	36
6.4. Estrés oxidativo	40
7. Técnicas de selección espermática	43
7.1. Introducción.....	43
7.2. Selección de espermatozoides no apoptóticos mediante columnas de anexina (MACS)	44
7.3. Selección de espermatozoides morfológicamente normales mediante IMSI.....	45
7.4. Selección de espermatozoides maduros mediante HBA	46
7.5. Selección de espermatozoides sin fragmentación de doble cadena	47
8. Terapias orales: el empleo de antioxidantes en fertilidad masculina	49
8.1. El estrés oxidativo en la fertilidad masculina	49
8.2. Empleo de antioxidantes en varones infértiles.....	50
9. Recomendaciones prácticas	53
9.1. ¿Cuándo congelar una muestra de semen?.....	53
9.2. Técnica de selección espermática de elección para ICSI	54
10. Manejo de espermatozoides testiculares	57
10.1. Valoración del uso de espermatozoides frescos y congelados.....	57
10.2. Aspectos metodológicos a considerar	58

INTRODUCCIÓN

Cuando una pareja acude a una consulta para estudio de esterilidad, la prueba más inmediata que se va a solicitar al varón es un análisis de semen. Sin embargo, puede que éste ya traiga un informe sobre una prueba realizada en otro centro o, incluso, además del seminograma, otra serie de pruebas diagnósticas que aporten información añadida.

La pregunta que con frecuencia se hace el clínico es ¿debo pedirle otro análisis de semen? ¿qué estudios necesito para conocer la calidad de semen del varón? y, ¿cómo va a influir el resultado en el tratamiento de reproducción asistida que necesite la pareja?

En ocasiones, si la técnica de elección por patología femenina va a ser la Microinyección espermática (ICSI), únicamente se solicita la realización de un análisis básico de semen que incluya únicamente concentración, movilidad y morfología, ya que se piensa que con ello es suficiente. Otras veces, el clínico solicita la realización de cuantas más pruebas mejor, pero sin tener conocimiento de cómo interpretarlas.

Todavía resulta más complicado cuando la pareja se ha realizado varios ciclos de fecundación in vitro, incluso con donación de ovocitos, y se sospecha de la existencia de un factor masculino. Pero ¿cómo evaluarlo?

Son muchos los manuales que existen sobre las pruebas que se deben incluir en el estudio seminal, cómo realizarlas, cuáles son los valores normales y las técnicas más idóneas en cada caso. El primero de ellos, la última edición del Manual de Estudio de Semen de la Organización Mundial de la Salud (OMS),¹ refiere pormenorizadamente cada una de las pruebas necesarias en esta valoración. No obstante, al clínico no le interesa cómo hay que llevar a cabo el análisis de semen: de eso se encargará el laboratorio. Lo que le concierne es cómo interpretar esos parámetros y cómo el diagnóstico seminal

influirá en la decisión que tome respecto a la pareja en estudio de reproducción. Todos los profesionales de la reproducción conocen la nomenclatura en los casos de patologías seminales, y cuáles son los valores normales en el seminograma. Pero si no es así, se consultan.

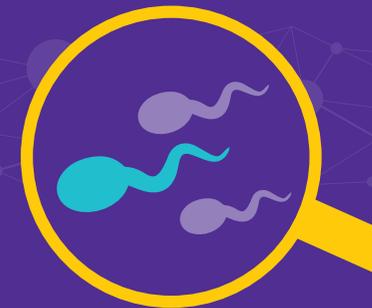
Con esta guía se pretende resolver, desde un punto de vista sencillo y práctico, las dudas más frecuentes que puede plantearse el clínico cuando tiene que evaluar un estudio de semen, es decir: qué pruebas se deben incluir, cómo interpretar los resultados y cuál puede ser la terapia más adecuada en cada caso.

Dra. Rocío Núñez Calonge

Dra. Ana Segura Paños

capítulo 1

EL VARÓN EN LA CONSULTA DE ESTERILIDAD: ¿QUÉ HAY QUE PEDIR INICIALMENTE?



Aunque existe una tendencia a solicitar todas las pruebas posibles al inicio del estudio del varón, muchas veces no todas aportan información relevante.

1.1. ESTUDIO BÁSICO SEMINAL

El análisis básico de semen es la prueba necesaria y obligatoria, aunque no la única, que debe realizar un varón al comenzar un estudio de esterilidad. Este examen, únicamente con los parámetros básicos: concentración, movilidad y morfología, puede aportar mucha información.

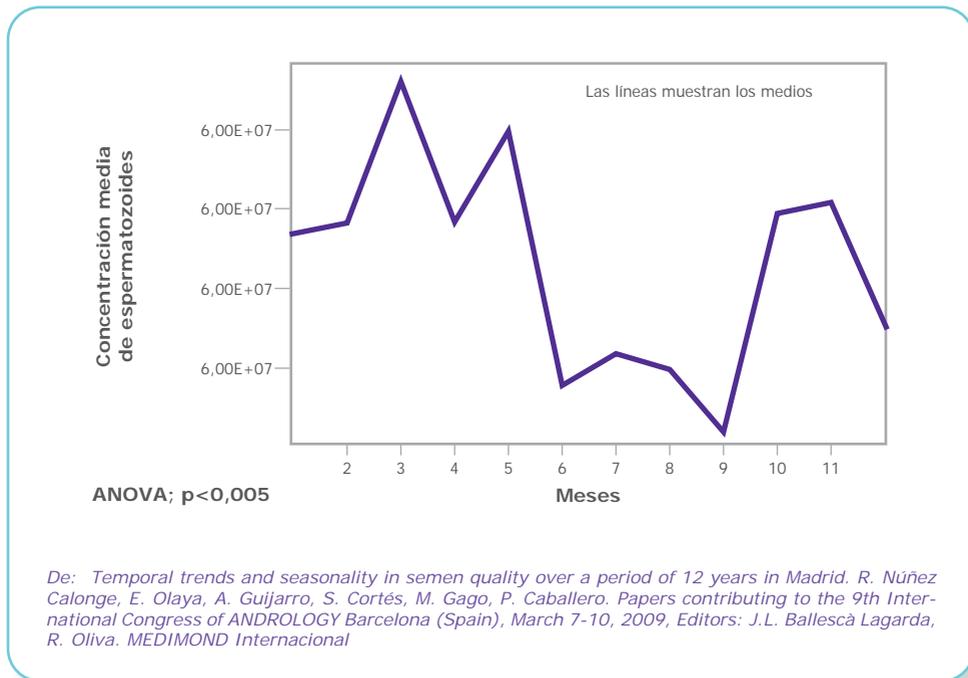
El resultado de un seminograma debe interpretarse de forma individualizada para cada varón y con cada prueba. Es importante tener en cuenta que la calidad de semen puede variar de un eyaculado a otro, ya que en la espermatogénesis intervienen muchos factores capaces de alterar la producción espermática.² En la **Figura 1** se puede comprobar como la concentración espermática en donantes de semen desciende significativamente en los meses de junio y septiembre.

Por eso, **se recomienda realizar al menos dos análisis de semen con un intervalo mínimo de un mes** para confirmar el diagnóstico inicial.

Desde un punto de vista práctico, se puede solicitar el análisis de semen al inicio del estudio, junto con el resto de las pruebas de la mujer, y posteriormente repetirlo.

Aunque existe una tendencia a solicitar todas las pruebas posibles al inicio del estudio del varón, muchas veces esto no hace más que gravar económicamente al paciente, sin aportar información relevante.

Figura 1. Variaciones de la concentración espermática en muestras de donantes de semen, a lo largo de un año. El análisis de varianza muestra una variación significativa entre las estaciones respecto al recuento espermático, con un claro descenso entre junio y septiembre (ANOVA; F:2,48; p <0,005)



Inicialmente, y si la pareja no ha realizado con anterioridad ningún tratamiento de reproducción asistida y el varón no tiene estudios previos, con un análisis de semen y una prueba de recuperación de espermatozoides móviles se puede obtener información relevante. (Tabla 1)

Tabla 1. Estudio seminal básico del varón

1ª visita: el varón en la consulta de esterilidad
Imprescindible: concentración, movilidad, morfología
Recomendable: Test de recuperación de espermatozoides móviles (REM)
Al menos dos seminogramas al inicio del estudio y antes del tratamiento
Interpretación individualizada de los resultados

1.2. CUESTIONARIO NECESARIO EN EL ANÁLISIS DE SEMEN

Previamente a la realización del seminograma es conveniente el cumplimiento de un pequeño cuestionario al varón que incluya las siguientes preguntas: tiempo de transporte desde la recogida de la muestra (en el caso de realizarse fuera del centro), pérdida de alguna fracción del eyaculado, tiempo desde la última eyaculación, frecuencia de eyaculaciones, último episodio febril, medicamentos actuales o recientes y tipo de trabajo que realiza. (Tabla 2)

Tabla 2. Cuestionario necesario en el análisis de semen

Método de obtención del eyaculado
Tiempo de recogida de la muestra
Pérdida de alguna fracción
Abstinencia sexual
Frecuencia de eyaculaciones
Último período febril
Ingesta de medicamentos
Ocupación actual

Estas preguntas son importantes, ya que pueden influir en el resultado final de la muestra, e incluso alterar el diagnóstico.

1.3. ¿CÓMO PUEDEN INTERFERIR EN LOS RESULTADOS ESTOS DATOS?

Método de obtención del eyaculado. Si el paciente obtiene la muestra en su domicilio, se recomienda que se realice por masturbación, ya que el coito interrumpido con frecuencia se acompaña de pérdida de parte del eyaculado y contaminación con fluidos y células vaginales. En caso de que el paciente no pueda obtenerla por masturbación, existen preservativos especiales, sin espermicida que pueden utilizarse en esos casos.

Tiempo de recogida de la muestra. La movilidad espermática disminuye con el tiempo. Si transcurre más de una hora desde la recogida hasta el análisis, puede que disminuya la movilidad, de forma que se diagnosticará una asteno-zoospermia cuando no la hay.

Pérdida de alguna fracción. La primera fracción del eyaculado es de origen prostático y contiene la mayor parte de los espermatozoides. La segunda fracción, que aporta el mayor volumen, procede de las vesículas seminales. Por ello, si en la

recogida del eyaculado se pierde alguna fracción, puede que con ella se haya perdido también gran parte del contenido espermático. Por eso es conveniente preguntar si la pérdida ha sido de la primera parte del eyaculado, o de la fracción final.

Tiempo desde la última eyaculación. Demasiada abstinencia sexual puede alterar parámetros como la morfología. Poca abstinencia puede afectar a la concentración. El tiempo recomendado de abstinencia es entre 2 y 5 días.

Frecuencia de eyaculaciones. No hay que olvidar que en primer lugar se intenta que la pareja conciba de forma espontánea. Relaciones sexuales demasiado frecuentes o muy espaciadas deben tenerse en cuenta en este sentido, debido al tiempo de la espermatogénesis.

Último episodio febril. La concurrencia de fiebre alta en un período de un mes o menos, además de alterar la espermatogénesis, puede confundir con una infección seminal si se combina con leucospermia.

Ingesta de medicamentos o suplementos alimenticios. Determinados medicamentos, como los anti-hipertensivos, tratamientos para la hipertrofia prostática, antidepresivos (sertralina, fluoxetina, amitriptilina) o determinados antibióticos, pueden alterar la calidad del semen. Los suplementos sin prescripción médica como los esteroides anabolizantes también pueden influir en la concentración y movilidad espermáticas.

Ocupación actual. es necesario considerar la influencia de determinadas ocupaciones (panaderos, conductores, pintores, etc.) en parámetros seminales como la fragmentación de ADN.

CONCLUSIONES

- El análisis de semen básico que incluye la determinación de concentración espermática, movilidad y morfología, es la primera prueba que debe realizarse en el estudio de esterilidad de la pareja estéril.
- Se recomiendan dos seminogramas con un intervalo entre ambos de un mes
- El cuestionario inicial realizado al varón en el análisis de semen debe incluir: método de obtención, tiempo de recogida, pérdida de alguna fracción, tiempo desde la última eyaculación, frecuencia de eyaculaciones, último episodio febril, ingesta de medicamentos y ocupación.
- Con estas preguntas se pueden obtener datos que influyan en el diagnóstico.

capítulo 2

INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS BÁSICO DE SEMEN

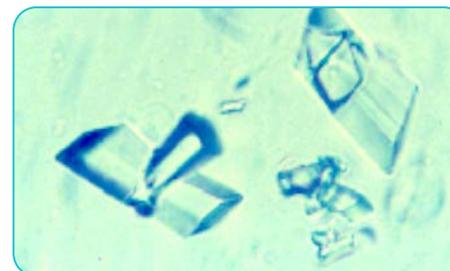
La interpretación del análisis de semen debe basarse en dos principios: conocer la etiología del problema y así, del diagnóstico seminal correcto, esclarecer el tratamiento de elección.

2.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO

En principio, y antes de analizar los distintos diagnósticos claros de infertilidad masculina, el examen macroscópico del eyaculado nos puede inicialmente orientar, en caso de anomalías, sobre distintos problemas seminales.

En el examen macroscópico del eyaculado se pueden encontrar, además de espermatozoides, cristales de fosfato de espermina (**Figura 2**) (que van aumentando conforme aumenta el tiempo desde la obtención de la muestra), y células epiteliales del tracto urinario.

Figura 2. Cristales de fosfato de espermina en una muestra de semen



Sin embargo, alteraciones en el aspecto de la muestra de semen pueden orientarnos hacia algunas patologías.

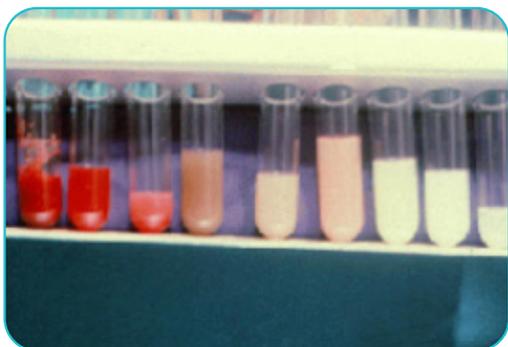
A simple vista, se pueden observar las siguientes alteraciones o variaciones en el eyaculado:

Color

Un color amarillento, puede ser indicativo de una infección, aumento en el número de leucocitos (leucospermia), o de la ingesta de determinados medicamentos, como algunos antibióticos.

Un color pardo o rojizo, puede mostrar la presencia de hematíes en el eyaculado (hemospermia), por el sangrado en algún punto del tracto reproductivo masculino. **(Figura 3)**

Figura 3. Muestras de varios eyaculados con distintos grados de hemospermia



Volumen

Un volumen demasiado bajo (menos de 1,5 ml) (hipospermia) o demasiado alto (más de 5 ml) (hiperespermia), pueden ser indicativos de patología prostática o de la vía seminal. En el caso de la hipospermia puede ser únicamente debido a pérdida de parte de la muestra en la recogida, pero también, junto con un pH ácido, una agenesia u obstrucción de la vía seminal. La hiperespermia puede ser demostrativa de una patología prostática. En cualquiera de estos dos casos es conveniente realizar una consulta urológica.

pH

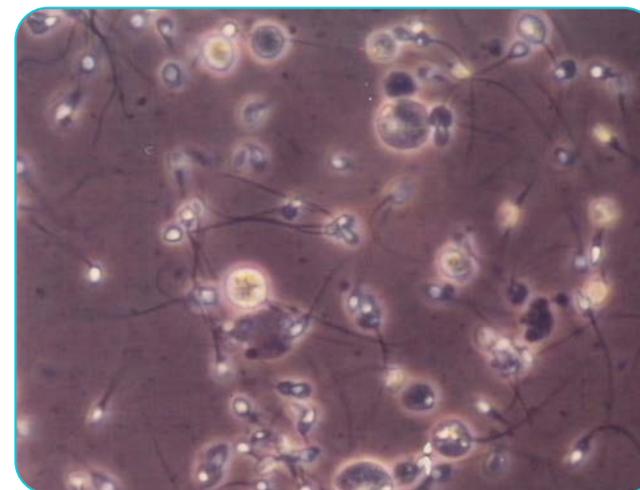
Un pH ácido, por debajo de 7, puede significar agenesia de vesículas, como se comentaba anteriormente, y si va acompañado de una hipospermia y azoospermia, signo de agenesia de vía seminal, lo cual puede indicar fibrosis quística.

Un pH básico, por encima de 8, puede únicamente significar que la muestra lleva mucho tiempo recogida, pues el pH va aumentando con el tiempo por oxidación de los componentes del plasma seminal.

Leucocitos

La presencia de un gran número de leucocitos en la muestra de semen (más de 6 por campo de 40x), puede ser indicativo de infección. **(Figura 4)**

Figura 4.- Muestra de semen con leucospermia



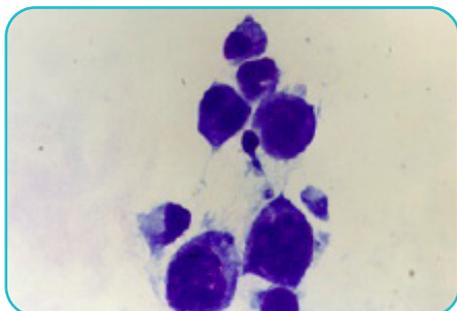
Viscosidad

Cuando la viscosidad está aumentada, se dificulta la movilidad espermática. Si es muy alta, y además el eyaculado tiene grumos, se puede recoger la muestra de semen directamente sobre medio de cultivo con alguna sustancia que facilite la disolución de los coágulos, como la hialuronidasa o la tripsina.

Células de espermiogénesis

Las espermátides y espermatozoides pueden diferenciarse de los leucocitos utilizando tinciones como el Papanicolaou. Un aumento de células germinales puede indicar una baja abstinencia sexual, ya que no ha dado tiempo a que se complete la producción y maduración espermática. Sin embargo, podemos considerar que hay una anomalía cuando hay más de 6 millones por ml de células germinales. Por eso, cuando se observa un gran número, es conveniente realizar una tinción para diferenciar el tipo de células encontradas. **(Figura 5)**

Figura 5. Células germinales teñidas con Papanicolaou en una muestra de semen



Células epiteliales

Son células del tracto urinario. También puede ocurrir que se observen células epiteliales vaginales, si la recogida de la muestra ha sido por coito interrumpido.

En la **Tabla 3** se resumen las alteraciones macroscópicas que hacen necesario que el paciente consulte con un andrólogo para descartar cualquier patología uroandrológica.

Tabla 3. Anomalías en el análisis macroscópico del eyaculado

Color	Amarillento: posible leucospermia o debida a medicamentos Pardo rojizo: hemospermia o presencia de hematíes Rojizo: hemospermia
Volumen	Hipospermia: pérdida de muestra o alteración/agenesia de las vesículas seminales Hiperespermia: alteración prostática o vesicular
pH	Ácido: pH<7 puede significar agenesia de vesículas Básico: pH>8 demasiado tiempo desde la obtención de la muestra
Leucocitos	>6 leucocitos por campo de 40x puede ser síntoma de infección

2.2. AZOOSPERMIA Y OLIGOZOOSPERMIA SEVERA

Los diagnósticos más claros de infertilidad masculina tras el seminograma son: **azoospermia**, **oligoastenoteratozoospermia (OTA)**, **astenoazoospermia severa** y **teratozoospermia severa**. En todos estos casos, la única técnica de reproducción asistida de elección sería la microinyección espermática (ICSI). Sin

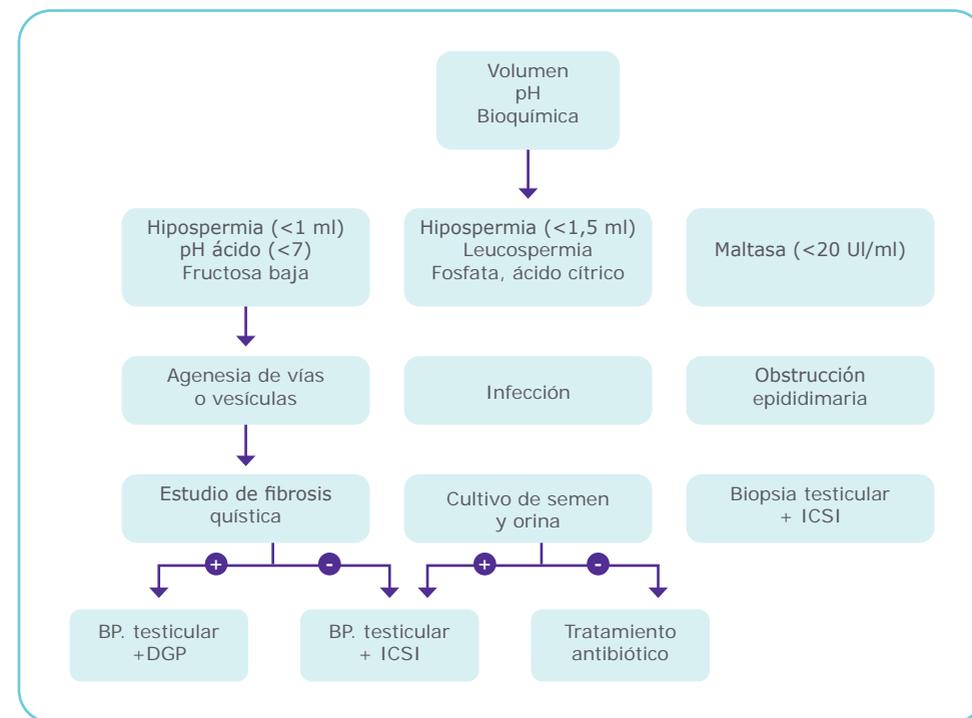
embargo, la observación detallada del análisis de semen en cada uno de estos casos nos puede aportar información relevante que incluso puede hacernos variar el tratamiento.

En función de los parámetros alterados del seminograma, se puede sospechar si la azoospermia u oligozoospermia es obstructiva o secretora. De esta forma, el abordaje puede ser diferente.

En el caso de la azoospermia u oligozoospermia obstructiva, comprobando el pH, el volumen y dos parámetros bioquímicos, podemos tener un diagnóstico aproximado que nos oriente en el tratamiento. Una hipospermia, un pH ácido y un valor de fructosa bajos, pueden indicar una obstrucción distal de la vía o una agenesia de la vía, lo que hace imprescindible el estudio de fibrosis quística. En el caso de hipospermia, leucospermia y alteraciones de la fosfatasa y/o ácido cítrico, podemos sospechar una infección, y una alfa-glucosidasa (maltasa) <20 UI/ml es indicativo de obstrucción epididimaria.

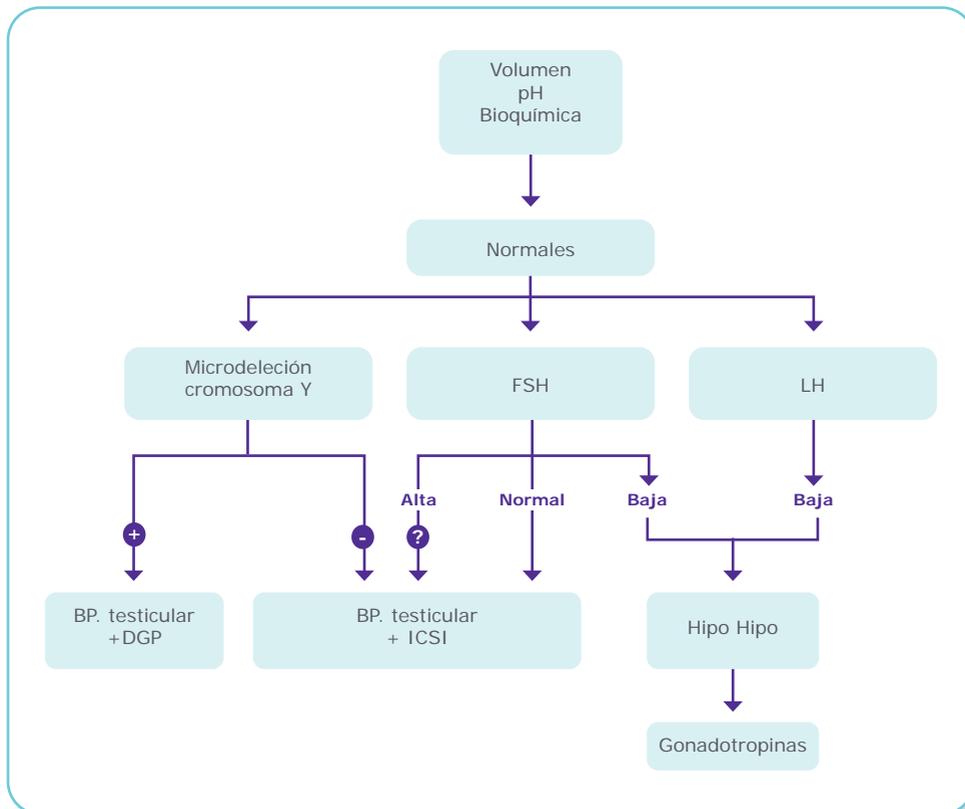
En la **Figura 6** se presentan las alteraciones que pueden darse en el análisis de semen en el caso de azoospermia o de una oligozoospermia obstructiva, así como su posible tratamiento.

Figura 6. Flujograma en el caso de azoospermia u oligozoospermia obstructiva



La observación detallada de los parámetros seminales también nos puede orientar en el caso de azoospermia y oligozoospermia secretoras, como se presenta en la **Figura 7**. En este caso, a pesar de la ausencia de espermatozoides, el volumen, el pH y los parámetros bioquímicos serán normales. Es entonces necesario realizar un estudio hormonal y de microdelección del cromosoma Y.

Figura 7. Flujograma en el caso de azoospermia u oligozoospermia secretora



Como se ha comentado anteriormente, aunque la técnica de elección en ambos casos es la ICSI, y en el caso de ser una azoospermia la recuperación espermática se realizará en el testículo, la posibilidad de encontrar espermatozoides es diferente, así como la información sobre probabilidades de éxito al paciente.

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que el diagnóstico definitivo sólo lo ofrecerá el estudio histológico.

2.3. ASTENOZOOSPERMIA SEVERA

Otra de las causas de infertilidad masculina fácilmente detectables en el análisis de semen es la falta de movilidad espermática casi por completo. En este caso es importante poder distinguir si además de astenozoospermia existe una necrozoospermia (más del 70% de los espermatozoides sin vitalidad).

En primer lugar, hay que descartar que la muestra no se haya recogido inadecuadamente, o que el tiempo de transporte, si se ha obtenido fuera del centro, haya sido excesivo. También hay que investigar causas exógenas o medioambientales como los hábitos del paciente (tabaco, alcohol, drogas, aumento de la temperatura escrotal, etc).

Si la astenozoospermia severa (<10% movilidad progresiva) se acompaña de necrozoospermia, es conveniente comprobar el índice de fragmentación de ADN espermático, ya que existe una asociación entre necrozoospermia y fragmentación de ADN.³

La astenozoospermia también está asociada a las infecciones, con o sin presencia de leucospermia. Por ello, se recomienda en estos casos realizar un cultivo de semen y orina.

Aunque raramente, algunos casos de astenozoospermia completa puede deberse a factores genéticos, como el síndrome de cilios inmóviles o síndrome de Kartagener. Para confirmar este diagnóstico es necesario, en ausencia de síntomas, un estudio de microscopía electrónica donde se comprueba la ausencia de brazos de dineína. **(Figura 8)**

Figura 8. Corte transversal del flagelo de un espermatozoide de un paciente con Síndrome de Kartagener, observado a microscopía electrónica, donde se puede comprobar que faltan los brazos de dineína



Antiguamente, cuando se observaban espermatozoides aglutinados sin movilidad progresiva y movimiento de "shaking" se realizaba la prueba de anticuerpos antiespermatozoides por la sospecha de origen inmunológico.

En la actualidad, este tipo de astenozoospermia puede tratarse con éxito utilizando ICSI por lo que no es necesario realizar más estudios. (Figura 9)

Figura 9. Muestra de semen con aglutinación espermática por presencia de anticuerpos anti espermatozoides



En los casos de encontrarse repetidamente un 100% de los espermatozoides inmóviles, y una vez descartadas patologías como el síndrome de cilios inmóviles, se aconseja la obtención de espermatozoides testiculares para ICSI.⁴

Las causas y posibles soluciones terapéuticas para la astenozoospermia se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Causas y posibles soluciones terapéuticas en los casos de astenozoospermia severa

Factores posibles	Causas	Soluciones
Factores ambientales	Recogida inadecuada de la muestra	Obtención de la muestra en el centro
	Tiempo de transporte	Terapia con antioxidantes orales
	Causas exógenas o medioambientales (tabaco, alcohol, aumento de la tª escrotal)	
Infecciones	Con presencia o no de leucocitos	Terapia antibiótica
Genéticas	Síndrome de cilios inmóviles	PGT
Inmunológicas	Presencia de anticuerpos anti-espermatozoides	ICSI
Clínicas	Varicocele	Estudio uroandrológico (cirugía)

2.4. TERATOZOOSPERMIA SEVERA

El papel de la morfología espermática en el estudio del factor masculino ha sido desde hace tiempo motivo de controversia. Algunos investigadores consideran que la morfología es el principal parámetro en el análisis de semen a la hora de predecir el potencial fertilizador,⁵ mientras que otros autores no encuentran ninguna correlación⁶. Sin embargo, las evidencias en largas series de FIV sugieren que la morfología de acuerdo con el criterio estricto proporciona una información pronóstica importante sobre la tasa de fecundación.⁷

Es reconocido que un porcentaje de espermatozoides morfológicamente anómalos de más del 98% en un eyaculado, tiene efectos negativos sobre la tasa de gestación.⁸

La teratozoospermia puede encontrarse de forma aislada al analizar un eyaculado, de forma que el resto de los parámetros básicos (concentración y movilidad) sean normales.⁹ (Figura 10)

Figura 10. Espermatozoides morfológicamente anómalos. Izquierda: espermatozoide con dos flagelos y a la derecha, espermatozoide con dos cabezas (microscopía óptica de 40x y tinción de Papanicolaou)



El punto de corte para decidir la realización de inseminación intrauterina, fecundación in vitro o ICSI es 2% de formas normales. Por debajo de esta cifra es recomendable ICSI, más aún si existe una oligoastenozoospermia asociada.

En los casos de 100% de formas normales, existe un mayor potencial de aumento de aneuploidías, por lo que es aconsejable realizar un estudio de FISH en espermatozoides de 5 sondas. Igualmente está indicado cuando persiste de forma notoria un defecto morfológico predominante (por ejemplo, cabezas amorfas, redondas, o dobles flagelos).¹⁰ (Tabla 5)

Tabla 5. Técnica de reproducción asistida recomendada en función de la morfología espermática

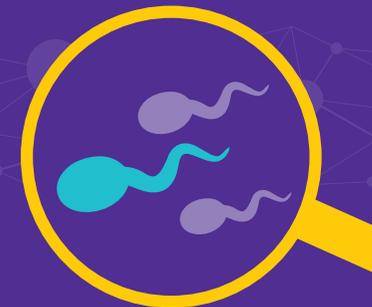
>98% morfoanomalías (independientemente del resto de los parámetros seminales)	ICSI
100% anomalías y/o defecto morfológico predominante	FISH Normal: ICSI Alterado: PGT

CONCLUSIONES

- Anomalías en el examen macroscópico del semen (color, volumen, pH, leucocitos, viscosidad, células de espermiogénesis), puede orientar hacia una patología urológica.
- En infertilidades claras como la azoospermia, oligoastenozoospermia severa, astenozoospermia severa y teratozoospermia, aunque la técnica de reproducción asistida es ICSI, la observación detallada de los parámetros del seminograma puede hacer necesaria la utilización de métodos complementarios.

capítulo 3

CUÁNDO ES NECESARIO Y CÓMO PEDIR UN CULTIVO DE SEMEN



Se explican en qué casos es necesario solicitar un cultivo de semen al varón, y cual es el procedimiento para realizarlo.

3.1. ¿POR QUÉ PEDIR UN CULTIVO DE SEMEN?

La presencia de leucocitos en el eyaculado de varones infértiles y su relación con la presencia de microorganismos, está ampliamente documentada. Niveles por encima de $1 \times 10^6/\text{ml}$ se considera patológico según criterios de la OMS.¹

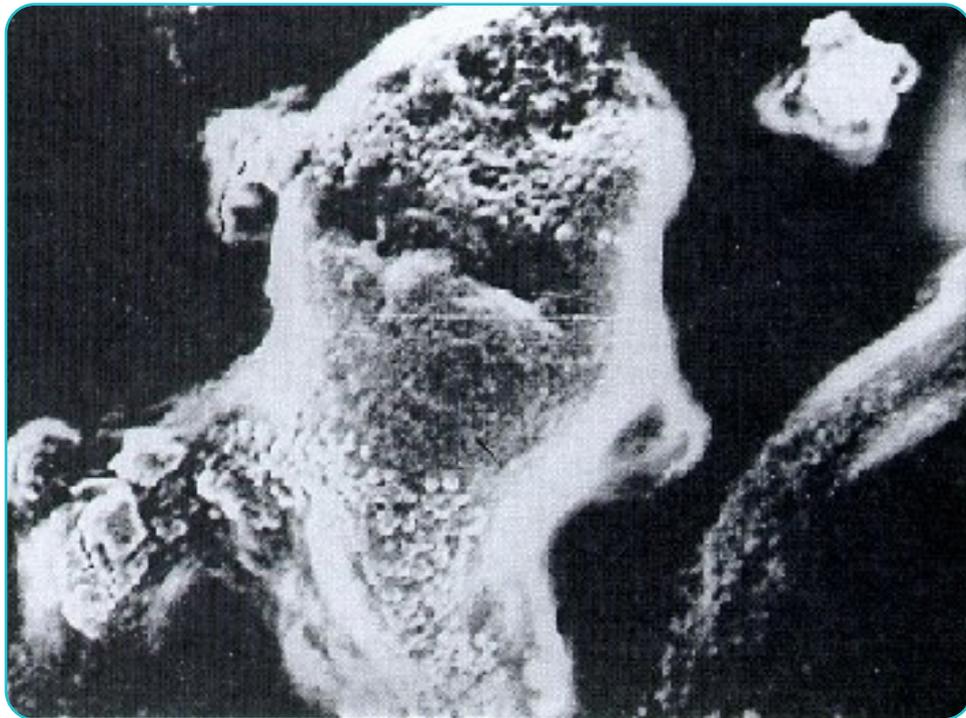
Es probable que los microorganismos hallados en el semen provengan principalmente de contaminación de la flora uretral o sean comensales de la piel. Aunque los comensales pueden no tener ningún significado en la concepción natural, la contaminación de un cultivo en reproducción asistida puede limitar en gran manera el éxito del proceso. Si la contaminación uretral contribuye significativamente a la bacteriospermia, la fracción media de la orina tendría menos concentraciones de microorganismos que la primera fracción, y la recogida del semen tras la orina puede ser un modo efectivo de reducir la concentración de microorganismos previo a un proceso de reproducción asistida.

Por otra parte, el papel de la infección en infertilidad debería analizarse mejor con respecto al microorganismo hallado que al lugar del que se sospecha la infección, de forma que el cultivo de semen debe de realizarse de la siguiente forma: estudio microbiológico de la primera fracción de orina,

estudio de la parte media de la micción y, finalmente, estudio microbiológico del semen. El estudio bacteriológico debe incluir análisis de micoplasmas (*Ureaplasma urealyticum*), dada su prevalencia y falta de sintomatología y antibiograma si procede.¹¹

En un estudio realizado en pacientes que acudieron a realizarse un seminograma por estudio de esterilidad¹² se encontraron microorganismos patógenos en el 33,5% de estos, y en un 26% *Ureaplasma urealyticum*. (Figura 11)

Figura 11. Espermatozoides incubados durante 24 horas con *Ureaplasma urealyticum* a microscopía electrónica de barrido (x6000) con colonias de ureaplasmas unidas a la cabeza y el flagelo



3.2. ¿CUÁNDO Y CÓMO SOLICITAR EL CULTIVO DE SEMEN?

En la **Tabla 6** se muestra en qué ocasiones es necesario pedir un cultivo de semen y en la **Tabla 7**, como debe de realizarse el cultivo.

Tabla 6. Cuando se debe de solicitar un cultivo de semen

Leucospermia	6 leucocitos por campo de 40x
Astenozoospermia severa	< 10% movilidad progresiva
Aglutinación espermática	
Hipospermia	< 1.5 ml volumen

Tabla 7. Cómo realizar el cultivo de semen y orina

Estudio microbiológico de la primera fracción de orina
Estudio microbiológico de la fracción media de la micción
Análisis microbiológico del eyaculado
Estudio de micoplasmas (<i>Ureaplasma urealyticum</i>) Antibiograma si procede

CONCLUSIONES

- En el caso de encontrar leucocitos, astenozoospermia severa, aglutinación o hipospermia en la muestra de semen, se debe de solicitar un cultivo de orina y semen con antibiograma si procede,



capítulo 4

RECUPERACIÓN DE ESPERMATÓZOIDES MÓVILES

Se habla de “espermatozoides capacitados” al referirnos a espermatozoides lavados e incubados con medio de cultivo, pero es más correcto referirnos a selección espermática o recuperación de espermatozoides móviles (R.E.M).

4.1. ¿POR QUÉ ES IMPORTANTE SOLICITAR UN REM?

Con el fin de que los espermatozoides sean funcionales, deben separarse lo más pronto posible del plasma seminal. La exposición prolongada de los mismos con los fluidos seminales hace que descienda considerablemente la movilidad y la viabilidad.¹³

Hay que tener en cuenta que nos referimos al comportamiento del espermatozoide “*in vitro*”, de manera que la acción del plasma seminal difiere de la que se le confiere en el entorno fisiológico.

El lavado del eyaculado para eliminar el plasma seminal rápida y efectivamente es pues, esencial, tanto en pruebas de laboratorio para comprobar la capacidad fertilizadora de los espermatozoides, como en inseminación intrauterina y fecundación *in vitro*.¹⁴

Con frecuencia se utiliza el término de “espermatozoides capacitados” al referirnos a espermatozoides lavados e incubados con medio de cultivo, esto es, imitando las condiciones de capacitación *in vivo*. Sería más correcto referirnos a selección espermática o recuperación de espermatozoides móviles (R.E.M), ya que la capaci-

tación espermática es un complejo proceso en el cual tienen lugar una serie de modificaciones en el espermatozoide, no siempre discernibles. Las condiciones empleadas "in vitro" tratan de emular a las fisiológicas, con la retirada del plasma seminal y resuspensión de los espermatozoides en medios que permitan la supervivencia y capacitación, pero realmente no podemos asegurar que la población de espermatozoides seleccionada se encuentre capacitada y sea capaz de fecundar un ovocito.

4.2. ¿QUÉ ES INTERESANTE CONOCER DEL REM?

Cuando el clínico se encuentra un informe con los datos de recuperación de espermatozoides móviles, lo que más le interesa saber es la cifra final de espermatozoides móviles que se dispone, bien por mililitro o en el total de volumen empleado.

Ya son conocidas las cifras aceptadas para la realización de una u otra técnica de reproducción asistida:

En inseminación intrauterina, el número mínimo para realizar la técnica oscila entre 5 y 6 millones de espermatozoides móviles por ml (con movilidad a + b). Por debajo de estas cifras, la tasa de gestación desciende considerablemente.

En el caso de fecundación in vitro el número de espermatozoides móviles necesario es algo menor: entre 2 y 3 millones de espermatozoides móviles por ml. Un número inferior hace necesario realizar Microinyección intracitoplasmática (ICSI).

En este capítulo no se van a explicar las distintas técnicas de recuperación espermática, pues este es un tema exclusivamente de laboratorio, y ya existen muchos manuales, incluidos el de la OMS, donde se describen los distintos métodos, aunque los más ampliamente utilizados son el swim-up (Figura 12) y los gradientes de densidad. (Figura 13)

Figura 12. Recuperación de espermatozoides móviles por el método de swim-up



Figura 13. Recuperación de espermatozoides móviles por el método de gradientes de densidad



Sin embargo, para seleccionar la técnica de reproducción asistida más adecuada hay que tener en cuenta otros factores representados en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Técnica de reproducción asistida más adecuada en función del número de espermatozoides recuperados (REM), supervivencia a las 24 horas y morfología espermática

	Supervivencia espermática 24 hrs	Morfología	TRA
6 millones esp/ ml	Positiva Negativa	>98% normales >98% normales <98% normales	IAC ICSI ICSI
3-6 millones esp/ml	Positiva Negativa	>98%normales <98% normales	FIV ICSI
< 3 millones esp/ml	-	-	ICSI

La supervivencia espermática nos da una idea del tiempo que los espermatozoides conservan la vitalidad. La supervivencia espermática a las 24 horas se relaciona con un fracaso o disminución de la tasa de fecundación o fallo de FIV. Una tasa baja de supervivencia también puede asociarse con una mayor fragilidad, muchas veces relacionada con la presencia de una elevada concentración de espermatozoides apoptóticos o con el ADN fragmentado.

Una teratozoospermia severa, o un único defecto morfológico aislado, como se ha comentado anteriormente, también puede disminuir la tasa de fecundación, por lo que, aunque el resto de los parámetros seminales sea normal, se recomienda ICSI como técnica de reproducción asistida de elección.

Desde el punto de vista práctico, el clínico debe tener en cuenta a la hora de evaluar el REM:

Es posible que la recuperación de espermatozoides no sea la esperada en muestras normozoospermicas. Si se descarta una mala preparación en el laboratorio, esto puede indicar la existencia de alguna patología seminal.

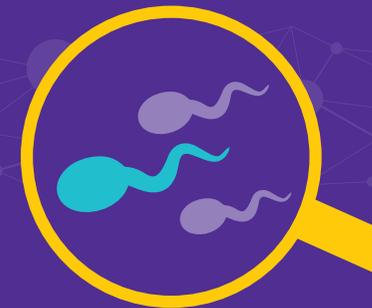
Es importante que después de la recuperación espermática, sea cual sea la técnica utilizada, no se demore más de una hora su utilización en reproducción asistida. Una vez que se ha separado el plasma seminal de los espermatozoides, aumenta más rápidamente la capacitación y la fragmentación de ADN. Esto es especialmente relevante en las muestras de semen congeladas y descongeladas, y más aún si se va a realizar inseminación intrauterina, incluso con semen de donante.

CONCLUSIONES

- La recuperación de espermatozoides móviles (REM) no solo se utiliza para aislar los mejores espermatozoides en todas las técnicas de reproducción asistida (TRA). Como diagnóstico, se emplea junto con la morfología y la supervivencia espermática para saber cual será la TRA de elección.
- Se pueden obtener recuperaciones bajas aún con muestras de semen normozoospermicas, lo que indica alguna patología subyacente.
- No se debe de tardar más de una hora en utilizar las muestras de semen para cualquiera de las técnicas de reproducción asistida una vez realizado el REM.

capítulo 5

EYACULACIÓN RETRÓGRADA



Para comprobar la existencia de una eyaculación retrógrada hay que comprobar la presencia de espermatozoides en la orina post-orgasmo.

5.1. ¿CÓMO SE DIAGNOSTICA LA EYACULACIÓN RETRÓGRADA?

Cuando el varón, tras la masturbación y consecución del orgasmo, no obtiene eyaculado (aspermia), es necesaria la consulta con el andrólogo para diagnosticar la patología asociada. La aspermia puede ir asociada con la eyaculación retrógrada, esto es, el eyaculado ingresa en la vejiga urinaria en lugar de salir por la uretra. Los espermatozoides, por lo tanto, refluyen hacia la vejiga tras un estímulo sexual. El origen puede ser diverso: cirugías, diabetes, etc.

Para comprobar la existencia de una eyaculación retrógrada hay que comprobar la presencia de espermatozoides en la orina post-orgasmo.

5.2. CÓMO RECUPERAR LOS ESPERMATOZOIDES DE LA ORINA

Los espermatozoides pueden aislarse de la orina, como se describe a continuación.

Para aislar los espermatozoides en los varones con eyaculación retrógrada, se procede de la siguiente forma:

En primer lugar, es necesario alcalinizar el pH de la orina. Para ello, se indica al varón la siguiente pauta de bicarbonato oral: 2 días consecutivos previos al tratamiento debe tomar una cucharada (tamaño café) de bicarbonato previa a cada comida principal. El día de la recogida de la muestra deberá tomar 2 cucharadas de bicarbonato dos horas antes de la masturbación.

Con el fin de no tener un volumen de orina muy grande cuando se quieran aislar los espermatozoides, se le indica al varón que orine una hora antes de la recogida de la orina post masturbación, y deseche esa orina.

El varón debe recoger la orina post masturbación en un frasco estéril, y si existe eyaculación, recogerlo en otro frasco previamente a la orina.

Se mide el pH de la orina para comprobar si está correctamente alcalinizada. En cualquier caso, es necesario procesar la muestra para la obtención de espermatozoides inmediatamente a la recogida, ya que en el medio en que se encuentran puede verse afectada más rápidamente su capacidad funcional.

La muestra de orina se procesa con el método de lavado habitual. Si es volumen es alto, es preferible primero un lavado con swim up y posteriormente gradientes de densidad. Si no, directamente se realizan gradientes de densidad.

CONCLUSIONES

- La aspermia puede deberse a la existencia de eyaculación retrógrada.
- En todos los casos de aspermia es necesaria una consulta urológica.
- En el caso de confirmarse una eyaculación retrógrada, pueden aislarse espermatozoides de la orina post-orgasmo.
- Para poder aislar los espermatozoides de la orina es necesario primero alcalinizarla.
- La orina obtenida después de la masturbación se procesa por *swim-up* o gradientes de densidad.

capítulo 6

OTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

6.1. ¿ POR QUÉ SON NECESARIAS OTRAS PRUEBAS ?

Existen muchos factores que no se miden en el seminograma que pueden contribuir a la infertilidad.

A pesar de la utilidad del análisis básico de semen para orientar en el diagnóstico de infertilidades claras, como se ha señalado anteriormente, en ocasiones no es suficiente para detectar una infertilidad masculina. Existen muchos factores que no se miden en el seminograma que pueden contribuir a la infertilidad. Los más importantes son: la existencia de aneuploidías, u otras alteraciones genéticas de los espermatozoides, fragmentación de ADN y aumento del estrés oxidativo. Estos tres factores pueden añadir información a la evaluación del semen cuando el seminograma no es concluyente.

Con frecuencia el clínico tiene dudas sobre cuál es la mejor prueba que tiene que realizarse el paciente para realizar un diagnóstico de infertilidad. A veces pide que se hagan todas, pensando que alguna de ellas le informará de alguna alteración. En otras ocasiones no cree que ninguna de ellas aporte información que le haga variar el tratamiento. Dada la falta de estandarización en las pruebas complementarias al seminograma, es por ello difícil determinar cuál es la adecuada. Además, cada prueba nos informa sobre un defecto espermático determinado, pero **no existe ninguna prueba que notifique varios aspectos de la función espermática al mismo tiempo**. Por ello, en ocasiones es necesario realizar más de un test en un paciente, ya que es difícil conocer cuál es exactamente la alteración.

En este capítulo se analizan qué información nos aporta cada una de estas pruebas, y cuáles son las indicaciones para solicitarlas.

6.2. PRUEBAS GENÉTICAS

FISH (*fluorescence in situ hybridization*) en espermatozoides

Determina la dotación cromosómica, expresando el porcentaje de espermatozoides que presentan aneuploidías o disomías. Permite evaluar el riesgo de transmisión de anomalías cromosómicas de origen paterno a la descendencia, en muestras de eyaculado, epidídimo y testículo.

Existe una amplia bibliografía que demuestra que los varones infértiles producen gametos con mayor tasa de anomalías cromosómicas que la población general.¹⁵ Específicamente, se ha relacionado una mayor frecuencia de aneuploidia y diploidia con una reducción en el número de espermatozoides, teratozoospermia, o en varones normozoospermicos con repetidos fallos de FIV o abortos recurrentes.¹⁶

Los estudios de FISH deben incluir cinco cromosomas: trisomías autosómicas (13, síndrome de Patau; 18, síndrome de Edwards; 21, síndrome de Down) y aneuploidías de los cromosomas sexuales.

Las indicaciones claras para la realización del FISH de espermatozoides son:¹⁷

- Oligozoospermia
- Teratozoospermia
- Fallo implantación
- Aborto repetición

Limitaciones del uso del FISH

- El estudio de FISH en espermatozoides de testículo se encuentra con la limitación del número de espermatozoides necesarios para realizar el análisis, que se aconseja debe ser superior al millón por ml.
- La interpretación de resultados en ocasiones es difícil, dado que cada laboratorio posee sus controles específicos, lo cual dificulta la estandarización.
- Pacientes con un porcentaje de aneuploidías mayor que los controles han conseguido gestación, lo que origina controversia sobre la utilidad del FISH.
- En ocasiones, se opta por la realización de un PGTa sin realización de FISH cuando existe un fallo de implantación o aborto de repetición.

Por lo tanto, ¿cuándo realizar el estudio de FISH?

Se recomienda la realización de FISH previo a un tratamiento de FIV/ICSI en el caso de oligo y/o teratozoospermia severas.

En los fallos de implantación o aborto de repetición se puede realizar el estudio del FISH o directamente un PGTa.

El estudio de FISH en espermatozoides es verdaderamente útil en los casos en los que la frecuencia de alteraciones cromosómicas es tan alta que la única opción válida es emplear semen de donante.

En el caso de encontrar un aumento de espermatozoides aneuploides o diploides en la muestra de semen es importante tener en cuenta su frecuencia respecto al control y el número de espermatozoides de ese varón. No es igual encontrar un 0,5% más de aneuploidías en un varón normozoospermico que en uno con OTA severa.

Tabla 9. Indicaciones del FISH

Indicaciones	Opciones en caso de alteración
Previo a tratamiento: Oligozoospermia y Teratozoospermia	PGTa ICSI Banco semen
Post tratamiento: Fallo implantación Aborto repetición	PGTa

Estudio de las microdeleciones del cromosoma Y

Las deleciones del cromosoma Y no siempre están unidas a la azoospermia, describiéndose 3 fenotipos con relevancia clínica:

- AZFa (5% total). Síndrome Sertoly
- AZFb. Bloqueo espermatogénico, cripto o azoospermia
- AZFc (60% total). Desde oligo severa a azoospermia

Las indicaciones para el estudio de microdeleciones cromosoma Y son la azoospermia secretora y OTA severas.¹⁸

Si la deleción está en regiones AZFa y/o AZFb existe una alta probabilidad de que no haya espermatozoides tras la biopsia de testículo, por lo que se recomienda no realizarla, e informar al paciente.

Las microdeleciones del cromosoma Y se transmiten siempre a la descendencia: azoospermia u oligoastenoteratozoospermia severa en los hijos varones. Ante la presencia de este defecto, se recomienda PGT o realización de ICSI con consejo genético.

Otro aspecto para tener en cuenta en varones con una **microdelección del cromosoma Y en la región AZFc con presencia de espermatozoides, es la necesidad de criopreservarlos** por si se desean utilizar en el futuro, ya que en la mayoría de las ocasiones la espermatogénesis no se conserva a lo largo del tiempo.¹⁹

Tabla 10. Tratamiento en función de la microdelección del cromosoma Y

AZFa AZFb	Posible ausencia de espermatogénesis	Banco de semen
AZFc	Si hay espermatozoides: transmisión a hijos varones	Consejo genético PGTa

6.3. INTEGRIDAD DEL ADN

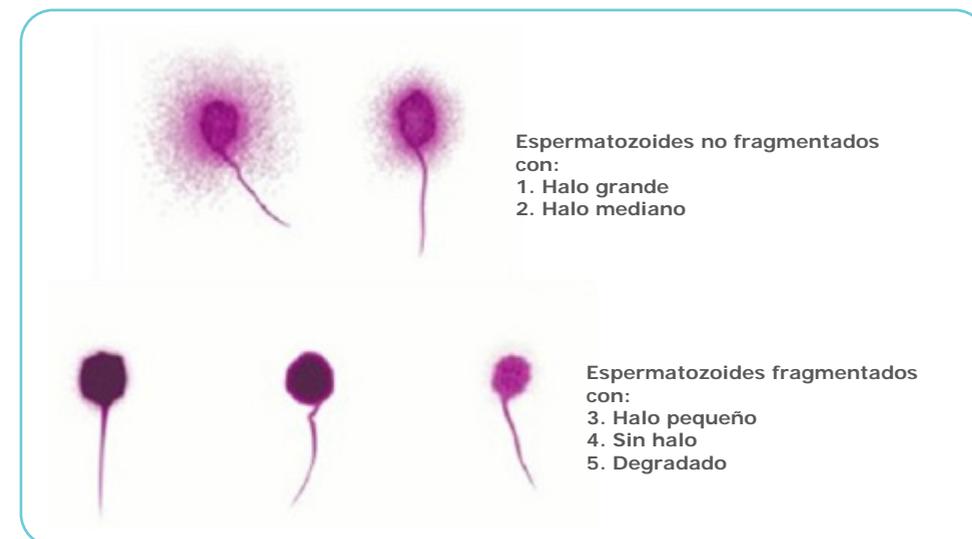
El estudio de fragmentación se basa en la detección de roturas en la molécula de ADN de los espermatozoides. Los principales mecanismos que causan roturas en el ADN espermático son: el estrés oxidativo (por efecto medioambiental o daño iatrogénico), la interrupción prematura del proceso de apoptosis y defectos de compactación de ADN durante la espermatogénesis.

Si existe alguna prueba diagnóstica que haya generado más discusión, publicaciones científicas y foros de debate, es la de fragmentación de ADN. Las principales causas de discrepancia de criterio en cuanto a su utilidad se deben principalmente a las diferentes técnicas de estudio existente, lo que dificulta su estandarización de los resultados, y a la confusión sobre su diferente etiología (ambiental o intrínseca al varón), lo que lleva a diferentes interpretaciones.^{20,21}

Las técnicas más utilizadas: **Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL)**, **Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)** y **Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test**, ofrecen un único valor de fragmentación de ADN independientemente del tipo de rotura (rotura de cadena sencilla o doble). La técnica de **Cometa neutro** puede detectar roturas de doble cadena de ADN.

La **Figura 14** muestra las imágenes resultantes de utilizar el protocolo SCD en el cual se observan los halos de dispersión de la cromatina.

Figura 14. Imágenes de espermatozoides fragmentados y no fragmentados tras la utilización del método SCD (Sperm Chromatin Dispersion)



En cualquier caso, aunque no esté del todo clara la relación entre el aumento del porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentados y los resultados clínicos en las técnicas de reproducción asistida, está demostrado que un aumento del índice de fragmentación en un eyaculado está relacionado con la infertilidad masculina, siendo mayor en el caso de varones infértiles que en los varones fértiles.²²

Sin embargo, **el test de fragmentación de ADN no puede discriminar entre individuos fértiles y no fértiles y si tendrá éxito la técnica de reproducción asistida que se realizará.**

La utilidad de cualquiera de las pruebas dependerá también de la fertilidad de la mujer.

Las indicaciones para realizar el estudio de fragmentación en varones son:

- Oligoastenoteratozoospermia moderada/severa
- Pacientes fumadores y/o expuestos a tóxicos ambientales
- Fallo de implantación
- Aborto de repetición

- Esterilidad de origen desconocido
- Edad mayor de 45 años.
- Previa quimio/radioterapia
- Varicocele
- Infecciones del tracto genital masculino
- Ovodonación si no embarazo en el primer ciclo

Condiciones para el estudio de fragmentación:

- Cualquiera de las técnicas: SDF, TUNEL, SCSA, SCD y Comet, ofrece información fiable.
- Punto de corte para considerar un aumento del índice de fragmentación: 20-30%
- La prueba debe realizarse tras 2-5 días de abstinencia sexual
- El estudio de fragmentación debe realizarse entre 30-60 minutos tras la licuación del semen o inmediatamente después de la descongelación.

Aunque hay autores que opinan lo contrario, el test de fragmentación tiene una alta variabilidad en individuos con baja calidad seminal, por lo que es conveniente repetir el análisis en estos casos.²³

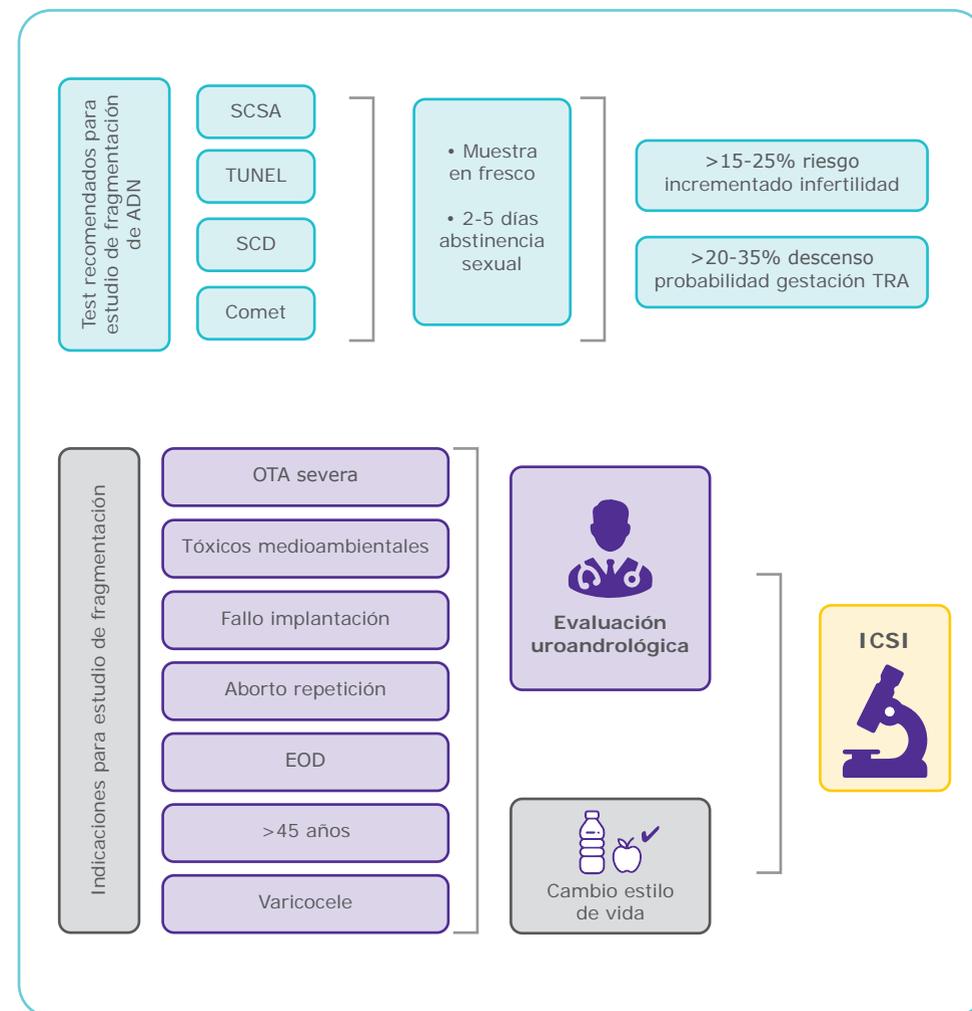
En la **Tabla 11** se muestran las propuestas para la actuación en los casos de alto índice de fragmentación.

Tabla 11. Métodos propuestos y valoración de estos para los pacientes con alto índice de fragmentación

Método propuesto	Comentario
Utilización de espermatozoides testiculares	No hay evidencias concluyentes. De utilidad solo en el caso de origen post testicular.
Antioxidantes	Si el aumento de la fragmentación está asociado a estrés oxidativo
Baja abstinencia sexual	En caso de normozoospermias o OTA moderadas, previo a ICSI
Congelación de la muestra de semen con menor fragmentación	Repetir estudio en los casos de OTA y congelar las muestras con menor fragmentación para su uso posterior en ICSI

En la **Figura 15** se presenta el resumen de las recomendaciones para el estudio de la fragmentación de ADN espermático y su posible manejo en pacientes con elevado índice de fragmentación.

Figura 15. Resumen de las recomendaciones para el estudio de la fragmentación de ADN espermático y su posible manejo en pacientes con elevado índice de fragmentación



6.4. ESTRÉS OXIDATIVO

Se ha demostrado que factores como el estilo de vida, el medio ambiente y algunos hábitos tóxicos pueden también afectar la calidad seminal debido al aumento del estrés oxidativo que produce unos niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (EROS).²⁴

Aunque se conoce que unos niveles fisiológicos de EROS son necesarios para el buen funcionamiento del espermatozoide, un desequilibrio entre la producción de EROS y la capacidad celular antioxidante tiene un impacto negativo en la fertilidad masculina.

Los niveles altos de estrés oxidativo en el semen se han asociado con una menor concentración y motilidad de los espermatozoides, así como a una menor integridad del acrosoma y a un mayor daño del ADN de los espermatozoides.²⁵

Causas del aumento del estrés oxidativo en el semen

Las células espermáticas inmaduras y anormales generan una mayor cantidad de EROS intracelular debido a la acción de la enzima citoplasmática glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa presente en los residuos citoplasmáticos de estas células.²⁶

Las otras células que pueden actuar como fuente endógena de EROS en el semen son los leucocitos. Los leucocitos y en especial los activados, pueden generar un aumento desproporcionado de las concentraciones de EROS en el semen, ocasionado un empeoramiento de la calidad seminal.²⁷

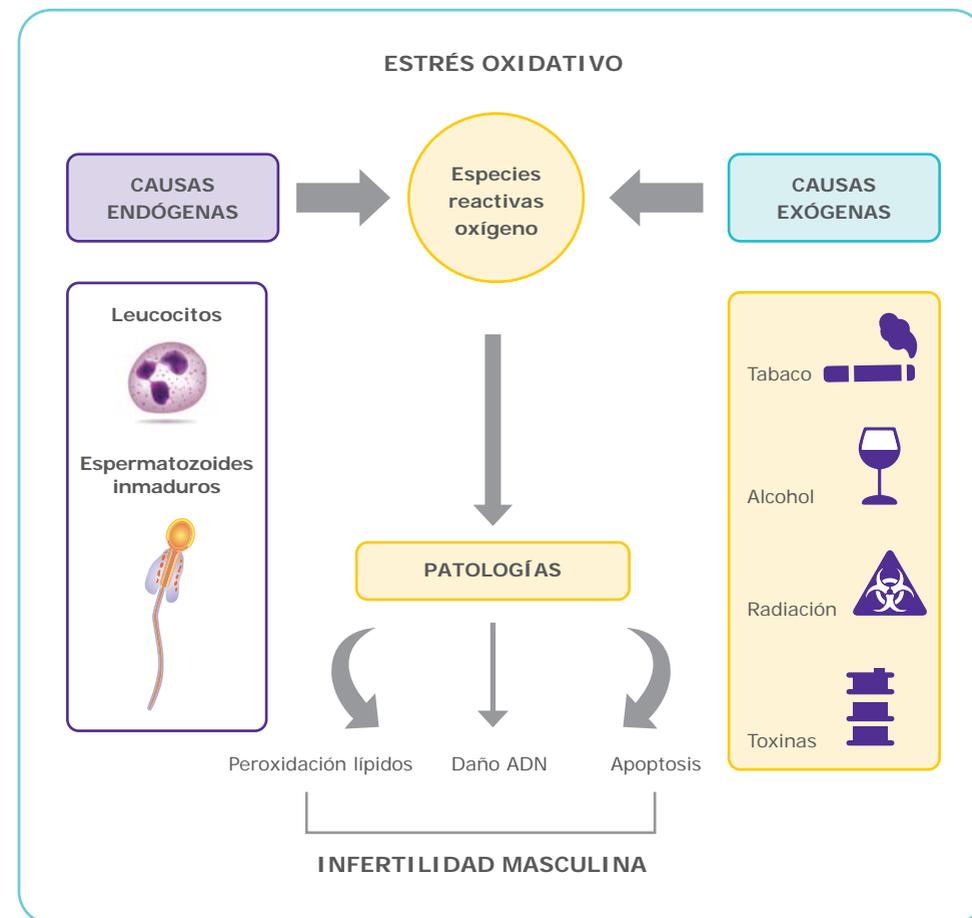
Existen componentes exógenos asociados a la exposición y metabolización de compuestos nocivos que también contribuyen al aumento de las EROS en el eyaculado como el humo del tabaco, los ácidos grasos de los alimentos, los metales de transición y el etanol, entre otros.²⁸ Algunos agentes físicos también pueden inducir la producción de las EROS como, por ejemplo, los rayos gamma, los rayos X y la irradiación ultravioleta.²⁹

Medición del estrés oxidativo

Aunque existen muchos métodos de medición del estrés oxidativo, recientemente, se ha desarrollado un sistema galvanostático (Mioxys) que nos indica el potencial de oxidación-reducción (ORP) de una muestra y es un método de detección directa del estrés oxidativo o del desequilibrio redox en muestras biológicas. Este análisis sirve como indicador del potencial EO y se ha demostrado que el ORP se correlaciona con varias condiciones patológicas asociadas al EO.³⁰ Actualmente, el sistema Mioxys puede medir el ORP de forma rápida y sensible y puede proporcionar una alternativa para medir de forma sencilla el EO de las muestras de semen

En la **Figura 16** se resumen las principales causas de estrés oxidativo en el varón y su efecto sobre la fertilidad.

Figura 16. Esquema de las posibles causas del estrés oxidativo en los varones, y su efecto sobre la fertilidad masculina

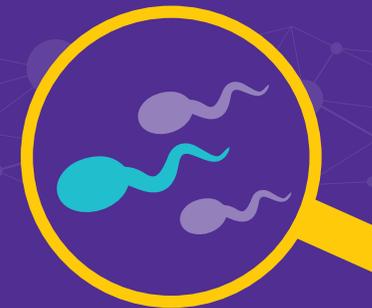


CONCLUSIONES

- Cuando no se encuentra la causa de la alteración espermática en el seminograma, se emplean pruebas complementarias para conocer si existen alteraciones genéticas (FISH y microdelección del cromosoma Y), alteraciones del ADN (fragmentación de ADN) o estrés oxidativo.
- No existe una única prueba que mida varias funciones espermáticas al mismo tiempo.

capítulo 7

TÉCNICAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA



Es importante conocer las técnicas existentes en la actualidad para la selección de espermatozoides no apoptóticos, morfológicamente normales, maduros o con ADN intacto.

7.1. INTRODUCCIÓN

Con la utilización del ICSI, se han podido obtener gestaciones en parejas cuyos varones presentaban muestras de semen muy límite. Sin embargo, aunque el ICSI ha revolucionado la reproducción asistida, también ha servido para comprobar que, aunque haya un número suficiente de espermatozoides móviles para poder emplearse en la microinyección, no todos pueden ser aptos para poder fecundar y conseguir una gestación.

Es por ello por lo que en los últimos años se han desarrollado varios métodos de selección espermática con el objetivo de escoger el mejor espermatozoide para ICSI. Esto es: **seleccionar espermatozoides euploides, no apoptóticos, maduros y con el ADN intacto.**

Los métodos que aquí se describen permiten la selección de espermatozoides maduros, no apoptóticos, morfológicamente normales y con el ADN intacto. Los más utilizados son: MACS (*magnetic-activated cell sorting system*), IMSI (*intra-cytoplasmic morphologically selected sperm injection*) y selección basada en la unión al ácido hialurónico (HBA).

Por último, se han desarrollado sistemas con cámaras microfluídicas para seleccionar espermatozoides que no tengan fragmentación de doble cadena.

7.2. SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES NO APOPTÓTICOS MEDIANTE COLUMNAS DE ANEXINA (MACS)

La externalización de la fosfatidil serina (PS) en la superficie externa de la membrana espermática, característico de la apoptosis, se ha empleado como base para la selección de espermatozoides no apoptóticos. La PS en la membrana externa puede unirse a microbeads conjugados con Anexina-V para separar junto con un sistema magnético (MACS), los espermatozoides apoptóticos de los normales.³¹

La técnica permite eliminar los espermatozoides con mayor grado de apoptosis mediante un sistema magnético que atrae a los mismos al hacerlos pasar por unas columnas imantadas. Previamente los espermatozoides se han puesto en contacto con una sustancia (Anexina) que se adhiere a los que presentan apoptosis.

Ya que en muchos casos los espermatozoides apoptóticos tienen un mayor grado de fragmentación, se ha demostrado que el empleo de MACS disminuye el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado, pero no tiene ningún efecto en los resultados cuando se utilizan indiscriminadamente en pacientes no seleccionados.³²

Por lo tanto, **la principal indicación de las MACS es el aumento de la proporción de espermatozoides fragmentados.**

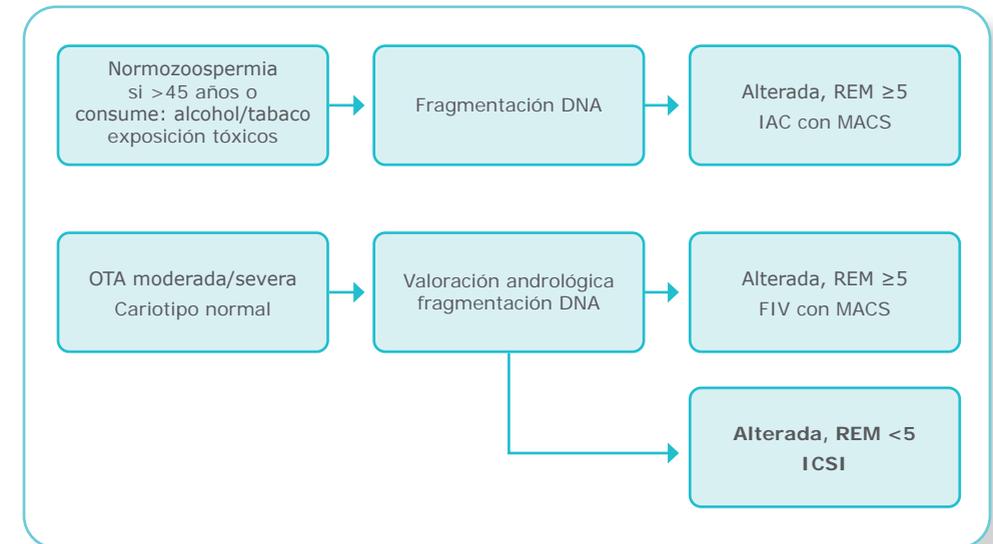
Cuándo utilizar MACS

La aplicación de las columnas de anexina se realizará en el momento de realizar la técnica de reproducción asistida cuando:

- La muestra de semen presente un índice de fragmentación >20% y
- La recuperación de espermatozoides móviles sea mayor de 5 millones/ml.

La **Figura 17** muestra un resumen del protocolo de actuación para la utilización de las columnas de anexina.

Figura 17. Protocolo de actuación para la utilización de MACS



7.3. SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES MORFOLÓGICAMENTE NORMALES MEDIANTE IMSI

Dado que la morfología se ha descrito como uno de los principales determinantes de calidad espermática, se ha desarrollado un método de selección de espermatozoides basado en la inclusión de espermatozoides morfológicamente normales, en tiempo real, analizando la morfología de las organelas (MSOME) a 6.300 aumentos.³³

Se estudian en total cinco organelas: acrosoma, lámina post acrosomal, cuello, flagelo y mitocondrias, que pueden clasificarse en normales o anómalas. La sexta organela, el núcleo, se evalúa por la forma y contenido de cromatina (área vacuolar). De las seis, la que más influencia se ha descrito que tiene en reproducción asistida es el núcleo, por lo que se modificó esta técnica en la llamada IMSI (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*).

Por otra parte, se ha asociado la presencia de vacuolas nucleares con un mayor índice de fragmentación de ADN y fallo de condensación de la cromatina.³³ El IMSI, por lo tanto, se emplea para seleccionar espermatozoides en el momento del ICSI, a 10.000 aumentos, que no tengan presencia de vacuolas.

Se han publicado diversos trabajos que presentan una mayor tasa de gestación en pacientes con OTA utilizando IMSI frente al ICSI convencional, aunque sin diferencias en la tasa de fecundación y calidad embrionaria.³⁴

Sin embargo, existen estudios que refieren la no existencia de una relación entre la presencia de vacuolas y ADN fragmentado e incluso, más recientemente, se ha publicado la ineficacia de esta técnica en la selección espermática para mejorar la tasa de gestación.³⁵

En la **Tabla 12** se presentan las ventajas e inconvenientes de la utilización de IMSI.

Tabla 12. Ventajas e inconvenientes en la selección de espermatozoides mediante IMSI

Ventajas	Inconvenientes
Selección de espermatozoides morfológicamente normales	Selección en muestras muy teratozoospermias difícil
	No hay clara asociación con aumento de tasa de gestación
	Demasiado tiempo para la búsqueda espermática, que puede ser lesivo para los espermatozoides y/o ovocitos
	Muy caro
	Falta de subjetividad de la selección

7.4. SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS MADUROS MEDIANTE HBA

En la naturaleza, los ovocitos humanos están rodeados por una envuelta de ácido hialurónico, implicado en el mecanismo de selección espermática. De hecho, solo los espermatozoides maduros que han extruido sus receptores específicos para unirse al ácido hialurónico pueden unirse al ovocito y fecundarlo.

La formación de sitios de unión al ácido hialurónico (*HA binding sites*) en la membrana plasmática de los espermatozoides es uno de los signos de madurez espermática y se ha utilizado como herramienta para la selección de espermatozoides maduros.³⁶

Con este fin, se ha desarrollado un dispositivo llamado placa de PCSI, con la cual se seleccionan espermatozoides que han completado la remodelación de la membrana plasmática, la extrusión citoplásmica y la madurez nuclear, teóricamente con menos índice de fragmentación de ADN.

Basándose en este principio, también se ha comercializado un medio de selección espermática, el Sperm Slow™, que representa una alternativa al PVP tradicional, compuesto principalmente de hialuronato. El principio de selección de este medio está basado en la unión de HA vía receptores a la cabeza de los espermatozoides.³⁷

Aunque existen algunas publicaciones que asocian la madurez espermática con la fragmentación de ADN³⁸ y con la menor frecuencia de aneuploidías en los espermatozoides maduros la mayoría de los estudios no correlacionan este método de selección espermática con la tasa de gestación en ICSI,³⁹ quizás por la inadecuada selección de pacientes.

7.5. SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS SIN FRAGMENTACIÓN DE DOBLE CADENA

Mediante la técnica de microfluidos se imitan las condiciones del tracto reproductivo femenino, facilitando la selección de espermatozoides con una mejor motilidad, morfología, y bajas tasas de fragmentación de ADN. La muestra seminal se utiliza sin ninguna preparación, no se centrifuga, por lo que se eliminan los daños que se producen durante ella y la generación de especies reactivas del oxígeno (EROS).

Chip FERTILE®

Es el sistema más utilizado.

El chip FERTILE® es un dispositivo que permite la selección de espermatozoides con mejor movilidad y menor fragmentación doble de la cadena de ADN.⁴⁰

¿Para quién está indicado?

El uso del chip FERTILE® está indicado en aquellos pacientes que presentan espermatozoides con fragmentación de cadena doble en su ADN. Estudios demuestran que el daño de cadena doble en el ADN de los espermatozoides es uno de los factores que puede estar implicado en los abortos de repetición y fallos de tratamientos de fecundación in vitro.⁴⁰

- Por tanto, sus principales indicaciones serían:
- Pacientes con un desarrollo embrionario lento en ciclos previos.
- Pacientes con fallos de implantación en ciclos de FIV anteriores.
- Abortos de repetición

Se ha demostrado que los **pacientes que consumen diariamente cafeína presentan valores de fragmentación de doble cadena mayores que los controles**. Por lo tanto, una de las recomendaciones para estos pacientes es evitar su consumo.⁴¹

Condiciones para realizar la técnica

Para poder saber si la fragmentación es uno de los factores implicados, antes de realizar el chip FERTILE®, es recomendable realizar el estudio del semen para evaluar si presenta daño de doble cadena.

Se necesita que la muestra de semen tenga al menos 5 millones de espermatozoides por mililitro, un 20% de espermatozoides con movilidad A+B y un 2% de espermatozoides de morfología normal.

La **Tabla 13** muestra las principales ventajas y desventajas del uso del chip FERTILE®.

Tabla 13. Principales ventajas y desventajas en la utilización del chip FERTILE® para la selección de espermatozoides para ICSI

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • No es necesario procesar la muestra: menor cantidad de EROS • Fácil y rápido • No afecta al cultivo embrionario • Separa espermatozoides con fragmentación de doble cadena 	<ul style="list-style-type: none"> • No se puede utilizar en factor masculino severo • No se puede utilizar en muestras congeladas • Previo estudio de fragmentación de doble cadena • Coste añadido al ciclo de ICSI

CONCLUSIONES

- Las técnicas más utilizadas para la selección de espermatozoides en ICSI son: MACS, HBA y cámaras de microfluidos.
- Estas técnicas seleccionan espermatozoides no apoptóticos, maduros o con el ADN intacto.
- Para que sean efectivas, las técnicas no deben de utilizarse de forma aleatoria, sino en pacientes seleccionados.

capítulo 8

TERAPIAS ORALES: EL EMPLEO DE ANTIOXIDANTES EN INFERTILIDAD MASCULINA

Se presenta el estado actual del uso de antioxidantes como mejora de la fertilidad masculina: indicaciones y compuestos utilizados.

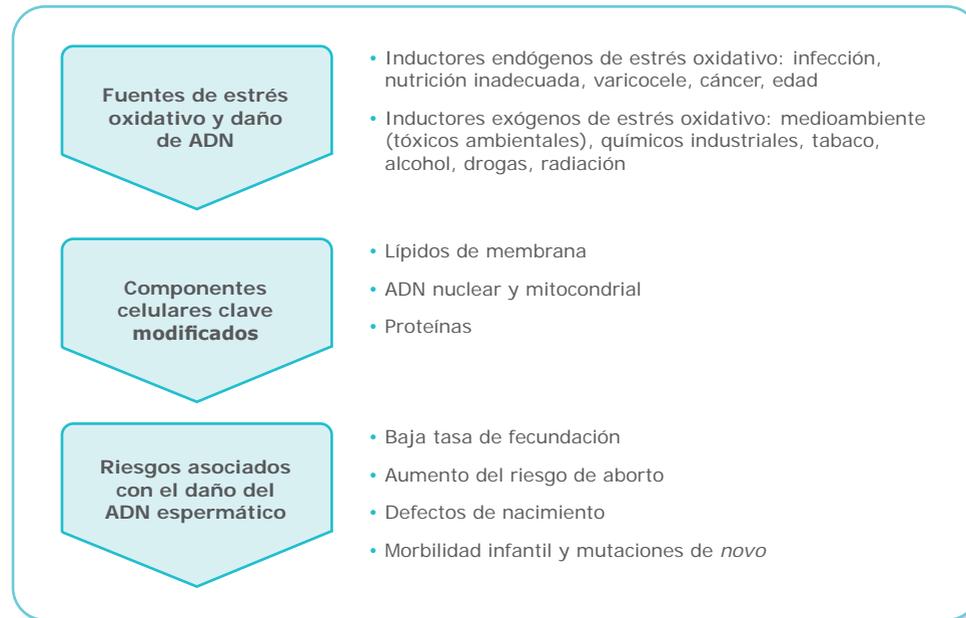
8.1. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA INFERTILIDAD MASCULINA

Diferentes estudios sugieren que entre el 30 y 80% de los pacientes infértiles presentan unos niveles elevados de especies reactivas del oxígeno (EROS) en el semen.²⁵ Aunque se conoce que unos niveles fisiológicos de EROS son necesarios para el buen funcionamiento del espermatozoide, un desequilibrio entre la producción de EROS y la capacidad celular antioxidante tiene un impacto negativo en la fertilidad masculina.

Anteriormente se ha comentado cuales son las principales causas que aumentan el estrés oxidativo en el varón y cómo las EROS influyen negativamente en los parámetros espermáticos y por tanto en la fertilidad masculina.

La **Figura 18** describe las fuentes principales de estrés oxidativo y daño del ADN, los componentes celulares que se modifican y los riesgos asociados con el daño del ADN espermático.

Figura 18. El estrés oxidativo: fuentes de estrés oxidativo, componentes celulares modificados y riesgos asociados



8.2. EMPLEO DE ANTIOXIDANTES EN VARONES INFÉRTILES

Dado el conocimiento existente sobre la influencia negativa del estrés oxidativo en el varón, el tratamiento de los varones infértiles con antioxidantes orales ha ido aumentando en la práctica clínica diaria.

Diferentes estudios han demostrado el efecto beneficioso del consumo de antioxidantes frente al daño oxidativo provocado por componentes ambientales y patológicos, mejorando así las características espermáticas, principalmente aquellas asociadas al análisis del seminograma y a las tasas de fertilidad.⁴² No obstante, la Asociación Europea de Urología en las guías clínicas sobre la Salud Sexual y Reproductiva Masculina de 2021 no apoya el uso generalizado de los tratamientos antioxidantes en la práctica clínica del hombre infértil.⁴³

Es importante tener en cuenta que, ya que no existe una correlación lineal entre calidad seminal y tasa de embarazo, **una mejora en los parámetros de semen no es el único objetivo que se debe considerar en los estudios con terapias antioxidantes.**

Por ello, las principales razones para desconfiar de la utilidad de los antioxidantes orales son:

- No se emplean métodos estandarizados para la medición de EROS'
- La mayoría de los estudios carecen de grupos control
- Se observan sesgos importantes en los estudios empíricos que analizan el impacto de los tratamientos en la tasa de embarazo.
- No hay consenso sobre los antioxidantes o principios activos que deben utilizarse ni el tiempo que deben de ser administrados.

Todo esto nos indica la necesidad de nuevos estudios basados en ensayos clínicos prospectivos, de doble ciego, aleatorizados, y controlados con placebo que validen la utilidad clínica tanto de las metodologías para determinar las EROS seminales, así como validar la efectividad de diferentes compuestos antioxidantes (solos o formulados) en el tratamiento de la infertilidad masculina.

Antioxidantes utilizados

Los antioxidantes orales que existen actualmente en el mercado se componen, principalmente de los siguientes principios activos: **Zinc (Zn)**, **coenzima Q10**, **L-Carnitina**, **DHA (ácido docosahexaenoico)** y **vitaminas (E, C)**.⁴⁴

Zinc

El zinc interviene en esteroidogénesis testicular, desarrollo testicular, consumo de oxígeno por parte de los espermatozoides, grado de condensación de la cromatina nuclear espermática, reacción acrosómica y conversión de testosterona en 5-alfa-dihidrotestosterona.

Coenzima Q10

La Coenzima Q10 es un agente productor de energía que se concentra en las mitocondrias de la pieza intermedia del espermatozoide. Recicla la vitamina E, impidiendo su actividad prooxidante. Se ha demostrado que la CoQ10 inhibe la formación de peróxido de hidrógeno en el plasma seminal de varones infértiles y su nivel está directamente relacionado con la movilidad espermática.

L-carnitina

La L-carnitina es un antioxidante de la dieta que disminuye las EROS. El 75% de la carnitina presente en los seres humanos procede de la dieta. La concentración más alta de carnitina se encuentra en el epidídimo, llegando a ser 2.000 veces superior a la plasmática. Sin embargo, los estudios controlados y aleatorizados no han demostrado ningún aumento concluyente de la movilidad o del número de espermatozoides.

DHA

El DHA (ácido docosahexaenoico), al igual que las vitaminas y minerales, no puede ser sintetizado por el organismo y únicamente puede obtenerse a través de la dieta, principalmente con la ingesta de pescado azul y algas marinas. En los últimos años se publicaron diferentes estudios que demuestran en el hombre la relación directa entre el enriquecimiento dietético en DHA y la mejora de la calidad de las células reproductoras. Sin embargo, no existe ningún estudio concluyente que demuestre la capacidad del DHA para mejorar la movilidad espermática.

Acido D-Aspártico

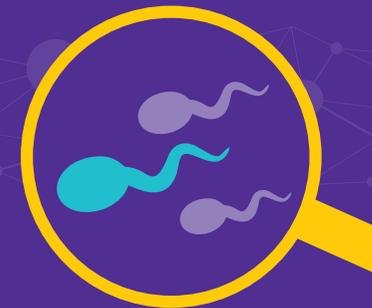
El ácido D-Asp se encuentra en el líquido seminal humano y en los espermatozoides, e interviene en la fertilidad masculina. La concentración de D-Asp en el líquido seminal y en los espermatozoides está significativamente reducida en sujetos oligoastenoteratospérmicos.

CONCLUSIONES

- No existe un consenso sobre la utilidad del empleo de antioxidantes en varones infértiles.
- Indicado en varones con OTA o Astenozoospermia idiopática o con alto índice de fragmentación de origen exógeno.
- Mínimo dos meses de terapia
- El compuesto utilizado debe de contener, como mínimo, zinc y coenzima Q10

capítulo 9

RECOMENDACIONES PRÁCTICAS



A veces, es conveniente tener previamente criopreservada una muestra de semen para evitar que el día del ICSI no haya espermatozoides.

9.1. CUÁNDO CONGELAR UNA MUESTRA DE SEMEN

Existen algunas situaciones en las que es conveniente tener previamente criopreservada una muestra de semen para evitar que el día del ICSI nos encontremos sin espermatozoides.

Aunque actualmente existe la opción de vitrificar los ovocitos el día de la punción, la posibilidad de que el varón no pueda obtener la muestra de semen o no se encuentren espermatozoides, es ciertamente estresante para la pareja y, sobre todo, para él mismo. Por ello, como medida de prevención, es recomendable la congelación de semen previa en los siguientes casos:

- Si el varón ha tenido dificultades de obtención del eyaculado los días de realización del análisis de semen.
- Cuando en el primer seminograma se diagnostica una OTA severa (menos de 1.000.000 espermatozoides/ml), ya que puede derivar en una azoospermia.

- Astenozoospermias severas idiopáticas.
- En caso de realizar una prueba de fragmentación que resulte patológica, repetir el análisis y congelar la muestra con menor IF.
- Ante todo paciente que vaya a someterse a quimio y/o radioterapia o cualquier otro tratamiento con capacidad de lesionar el epitelio germinal

9.2. TÉCNICA DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA DE ELECCIÓN PARA ICSI

Las pruebas de selección espermática descritas proporcionan información sobre una determinada capacidad del espermatozoide, pero hasta el momento no existe un único test que sea capaz de seleccionar el mejor espermatozoide para ICSI.

A este problema se añade la amplia información que ofrece la literatura con resultados en muchas ocasiones, contradictorios.

La alternativa es conocer cual es la alteración que presentan los espermatozoides y emplear para ello la técnica más idónea, o incluso utilizar varias de ellas que nos ayuden a seleccionar el mayor número de espermatozoides viables.

No obstante, existe un criterio unánime que considera que el aumento de espermatozoides con el ADN fragmentado incide negativamente sobre los resultados de fecundación, calidad embrionaria, implantación y finalmente, tasa de nacido vivo.

Y aunque los defectos en la condensación de la cromatina, aumento de apoptosis, inmadurez espermática y estrés oxidativo son fenómenos diferentes, todos ellos están íntimamente relacionados: espermatozoides con alteraciones de la compactación de la cromatina pueden ser susceptibles de daño oxidativo que conduce a apoptosis. Estas alteraciones pueden ocasionar roturas de doble cadena de ADN o de cadena sencilla.

Es importante tener en cuenta que, utilizar estos métodos al azar, no mejorará los resultados.

La **Tabla 14** resume las principales técnicas de selección espermática y su utilización para reproducción asistida en función de la indicación.

Tabla 14. Técnicas de selección espermática y su utilización en reproducción asistida en función del diagnóstico inicial y las condiciones de uso

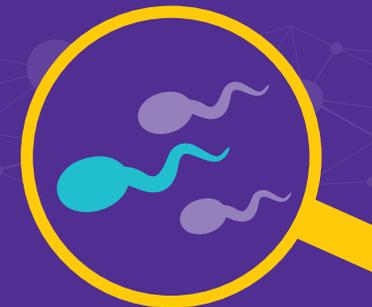
Técnica de selección espermática	Qué mide	Indicación	Condiciones	TRA
MACS	Apoptosis	IF > 20%	> 5 millones/ml REM	IAC, FIV, ICSI
IMSI	Morfología	Teratozoospermia		ICSI
HBA	Madurez	OTA Fallo implantación		ICSI
Microfluidos	Fragmentación doble cadena	Fallo implantación Aborto repetición	Medición IF doble cadena previa > 5 millones/ml fresco	ICSI

CONCLUSIONES

- En determinadas situaciones donde puede existir la posibilidad de no encontrar espermatozoides el día de la punción ovocitaria, se recomienda criopreservar espermatozoides de forma preventiva.
- No existe un método seguro, fiable y contrastado para seleccionar muestras de semen con ADN intacto, espermatozoides maduros, no apoptóticos y euploides, pero se pueden utilizar diferentes estrategias al mismo tiempo con el fin de disminuir esta incidencia.

capítulo 10

MANEJO DE ESPERMATOZOIDES TESTICULARES



10.1. VALORACIÓN DEL USO DE ESPERMATOZOIDES FRESCOS Y CONGELADOS

La extracción de espermatozoides testiculares (TESE) en combinación con la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se ha demostrado como un método efectivo para el tratamiento de la azoospermia obstructiva y no obstructiva. El éxito del ICSI con espermatozoides testiculares condujo a la utilización de estos espermatozoides congelados y descongelados. El uso de la criopreservación de espermatozoides testiculares puede así reducir el número de procedimientos quirúrgicos necesarios para conseguir una gestación, evitando repetidas biopsias de testículo.⁴⁵

Sin embargo, los datos publicados comparando resultados de ICSI con espermatozoides de testículo frescos frente a congelados, son motivo de controversia.⁴⁶ Incluso después de comprobarse que la tasa de gestación es comparable en ambos casos, todavía existen grupos que prefieren la utilización de espermatozoides testiculares el mismo día de la punción, con lo que ello conlleva desde el punto de vista organizativo, como es la posibilidad de no encontrar espermatozoides testiculares y, sin embargo, disponer de los ovocitos de la paciente.

Esta disparidad de resultados, así como la indecisión en utilizar los espermatozoides criopreservados, se debe, fundamentalmente, al método de procesamiento de la muestra de biopsia de testículo, el aislamiento de espermatozoides y su criopreservación.

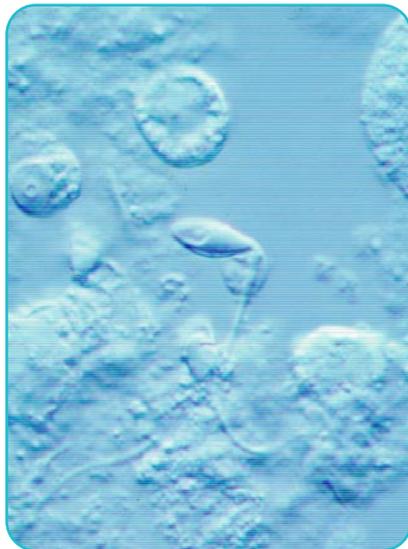
En los pacientes azoospermicos, es aconsejable el empleo de espermatozoides criopreservados para la realización de ciclos de ICSI, ya que dispondremos de espermatozoides congelados para sucesivos ciclos.⁴⁷

10.2. ASPECTOS METODOLÓGICOS A CONSIDERAR

Para obtener unos resultados de fecundación, calidad embrionaria y gestación con espermatozoides testiculares criopreservados similares a los conseguidos con espermatozoides de eyaculado, es necesario considerar una serie de aspectos metodológicos:

En primer lugar, es importante tener en cuenta que los espermatozoides testiculares, desde el punto de vista fisiológico, no tienen el mismo comportamiento que los espermatozoides de eyaculado. (Figura 19) En el testículo, los espermatozoides todavía no han alcanzado la capacidad de movilidad, por lo que, después de una TESE es frecuente encontrar espermatozoides en número suficiente, pero sin movilidad. Los espermatozoides testiculares adquieren la movilidad después de un tiempo de cultivo en el laboratorio, que es variable dependiendo de los casos.

Figura 19. Muestra obtenida de testículo donde se observan espermatozoides inmaduros y células de Leydig



Por ello: no se debe desechar una muestra de testículo, aunque en principio no se observen espermatozoides móviles.

Siempre que se realice una TESE es necesario realizar estudio anatomopatológico, el cual nos orientará posteriormente sobre el diagnóstico del varón y la posibilidad de encontrar espermatozoides viables.

Es aconsejable realizar la incubación de espermatozoides después de su congelación, en vez de antes de la misma para poder recuperar mayor número de espermatozoides móviles.

Es preferible incubar los espermatozoides hasta que adquieran movilidad en lugar de utilizar compuestos que activen la misma como la pentoxifilina.

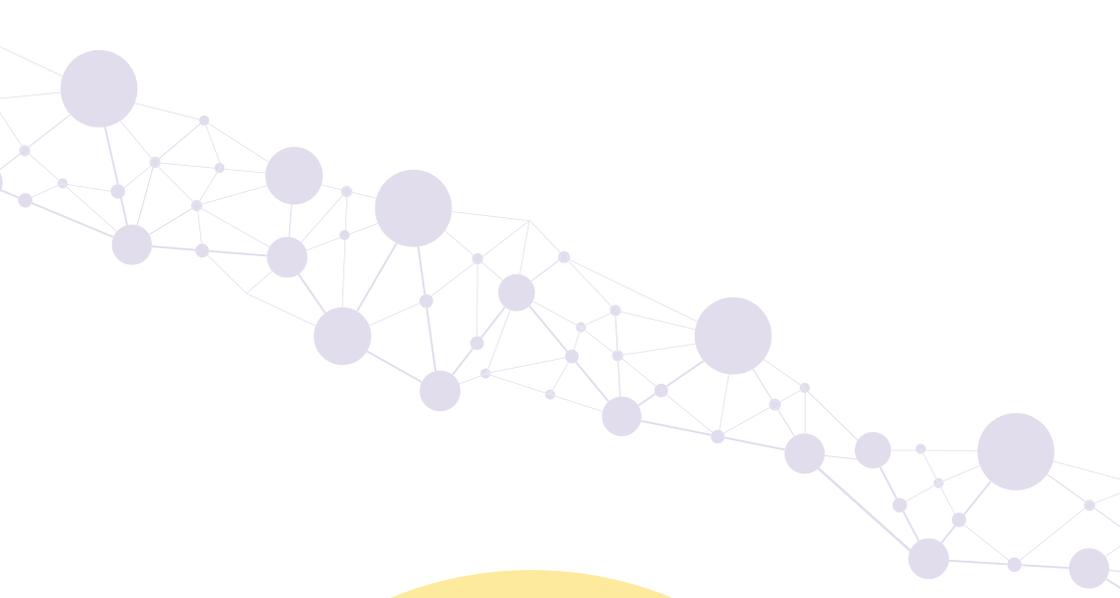
CONCLUSIONES

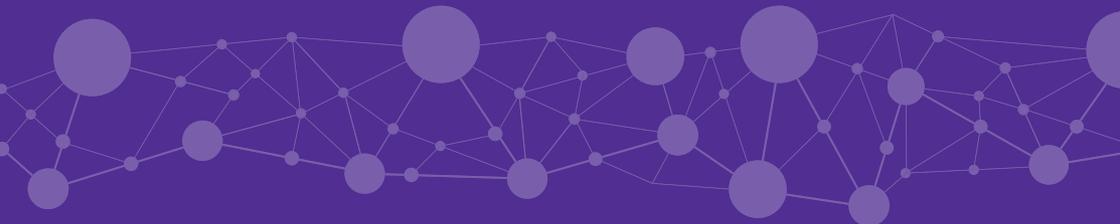
- En los pacientes azoospermicos, es aconsejable el empleo de espermatozoides criopreservados para la realización de ciclos de ICSI, ya que dispondremos de espermatozoides congelados para sucesivos ciclos y los resultados son comparables a la utilización de espermatozoides en fresco.
- Es imprescindible realizar estudio anatomopatológico
- Si hay espermatozoides en la muestra de testículo hay que criopreservarlos, aunque no tengan movilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 6th ed.; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2021. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>.
2. Temporal trends and seasonality in semen quality over a period of 12 years in Madrid. R. Núñez Calonge, E. Olaya, A. Guijarro, S. Cortés, M. Gago, P. Caballero. Papers contributing to the 9th International Congress of ANDROLOGY Barcelona (Spain), March 7-10, 2009, Editors: J.L. Ballescà Lagarda, R. Oliva. MEDIMOND Internacional.
3. Characterization of sperm DNA damage in Kartagener's syndrome with recurrent fertilization failure: Case revisited. Nuñez R, López-Fernández C, Arroyo F et al. Sex Reprod Healthc 2010;1(2):73-5.
4. Ortega C, Verheyen G, Raick D et al. Absolute asthenozoospermia and ICSI: ¿what are the options? Human Reproduction Update 2011;(17) 5:684-69.
5. Oehninger S et al. Semen quality: is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection? Human Reprod 1998;(13)8:2161-64.
6. Serchchioli R, Porcu EE, Falmingi C. Sperm morphology is not the only criteria of male infertility. Human Reprod 1995;(10):1039-41.
7. Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ et al. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. Fertil Steril 1994;(62):559-67.
8. Mazaheri Moghaddam M, Mazaheri Moghaddam M, Hamzei H, Baghbanzadeh A, Pashazadeh F, Sakhinia E. Genetic basis of acephalic spermatozoa syndrome, and intracytoplasmic sperm injection outcomes in infertile men: a systematic scoping review. J Assist Reprod Genet. 2021 Mar;38(3):573-586.
9. TroLoudes DM et al. Pregnancy with spermatozoa from a globozoospermic man after intracytoplasmic sperm injection treatment. Human Reprod 1995;(10)4: 880-2.
10. Osawa Y, Sueoka K, Iwata S et al. Assessment of the dominant abnormal form is useful for predicting the outcome of ICSI in the case of severe teratozoospermia. J Assist Reprod Genet 1999;16(8):436-42.
11. Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, et al. Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. Human Reprod 1998;(13) 10:2756-61.
12. Rocío Núñez Calonge, Susana Cortés Gallego, Pedro Caballero Peregrín; Análisis microbiológico del semen de los varones en estudio de infertilidad Revista Internacional de Andrología July 2007 Volume 5, Issue 3Pages 206-211.
13. Mortimer D, Courtot A.M. Giovangrandi Y et al. Human sperm motility after migration into and incubation in, synthetic media. Gamete Res 1984(9): 131.
14. Mortimer D. Objective analysis of sperm motility and kinematics. In Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. Keek B.A and Webster B.W., Eds. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.pp, 345-347.
15. Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F. Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility—a review. Placenta. 2003;24(Suppl B):S62-5.
16. Sarrate Z, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Egozcue J, Vidal F. FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling. Asian J Androl. 2005;7(3):227-36.
17. Zaida Sarrate, Joan Blanco, Fernando Marina-Rugero, Juan Manuel Moreno-García, Miguel Ruiz-Jorro, Rafael Lafuente-Varea, Fernando Graña-Zanón, Rocío Núñez-Calonge, Jorge Ten, Joaquín Rueda. The use of fluorescence in situ hybridization analysis on sperm: indications to perform and assisted reproduction technology outcomes.
18. Choi JM, Chung P, Veeck L et al. AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 2004;(81)2:337-41.
19. Núñez Calonge R, Cortés Gallego S, González-Viejo Gómez L et al. Nacimiento de una niña sana tras un ciclo de inyección intracitoplasmática con espermatozoides testiculares descongelados de un varón con microdeleción de la región AZFc del cromosoma Y. Rev Int Androl 2007;5(3).
20. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanism of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. Fertil Steril 2010;(93):1027-36.
21. Esteves SC, Zini A, Coward RM, Evenson DP, Gosálvez J, Lewis SEM, Sharma R, Humaidan P. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. Andrologia. 2021 Mar;53(2):e13874.
22. Agarwal A, Farkouh A, Parekh N, Zini A, Arafa M, Kandil H, Tadros N, Busetto GM, Ambar R, Parekattil S, Boitrelle F, Sallam H, Jindal S, Ko E, Simopoulou M, Park HJ, Sadighi MA, Saleh R, Ramsay J, Martinez M, Elbardisi H, Alvarez J, Colpi G, Gosálvez J, Evenson D, Shah R. Sperm DNA Fragmentation: A Critical Assessment of Clinical Practice Guidelines. World J Mens Health. 2022 Jan;40(1):30-37.
23. Núñez Calonge, R., Andrés Guijarro, J., Cortés, S., Caballero, P., & Gosálvez, J. (2021). Variaciones intraindividuo del índice de fragmentación del ADN espermático. Revista Iberoamericana De Fertilidad Y Reproducción Humana, 38(1 Enero-Febrero-Marzo).
24. Balawender, K. & Orkisz, S. The impact of selected modifiable lifestyle factors on male fertility in the modern world. Central European journal of urology 73, 1-6 (2020).
25. Ambar, R. F., Parekh, N. & Agarwal, A. Recent advances and controversies in diagnosing and treating male infertility. Faculty reviews 9, 1-8 (2020).

26. Gomez, E. et al. 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. *Journal of Andrology* 17, 276–287 (1996).
27. Henkel, R. R. Leukocytes, and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian journal of andrology* 13, 43–52 (2011).
28. Sharma, R., Harlev, A., Agarwal, A. & Esteves, S. C. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-Analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *European urology* 70, 635–645 (2016).
29. Alahmar, A. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *Journal of human reproductive sciences* 12, 4–18 (2019).
30. Agarwal, A. et al. multi-center evaluation of oxidation-reduction potential by the MiOXSYS in males with abnormal semen. *Asian journal of andrology* 21, 565–569 (2019).
31. Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedo C, Carro M, Papier S, et al. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2010; 20: 320–3.
32. Mei J, Chen LJ, Zhu XX, Yu W, Gao QQ, Sun HX, Ding LJ, Wang JX. Magnetic-activated cell sorting of nonapoptotic spermatozoa with a high DNA fragmentation index improves the live birth rate and decreases transfer cycles of IVF/ICSI. *Asian J Androl.* 2021 Oct 22.
33. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003;(80):1413–9.
34. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A et al. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2006;(21):1787–1790.
35. De Vos A, Van de Velde H, ¿Bocken G et al. Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling-oocyte study. *Human Reproduction*, 2013;(28)3:617–626.
36. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;(79) 3:1616–1624.
37. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci C, Cayli S, Delpiano E, et al. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspect. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; 14:650-63.
38. Scaruffi P, Bovis F, Casciano I, Maccarini E, De Leo C, Gazzo I, Massarotti C, Sozzi F, Stigliani S, Anserini P. Hyaluronic acid-sperm selection significantly improves the clinical outcome of couples with previous ICSI cycles failure. *Andrology.* 2022 Jan 24.
39. Lepine S, McDowell S, Searle LM, Kroon B, Glujovsky D, Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Jul 30;7(7):CD010461.
40. Pujol A, García-Peiró A, Ribas-Maynou J, Lafuente R, Mataró D, Vassena R. A microfluidic sperm-sorting device reduces the proportion of sperm with double-stranded DNA fragmentation. *Zygote.* 2021 Jul 27:1-6.
41. Schmid, T.E.; Eskenazi, B.; Baumgartner, A.; Marchetti, F.; Young, S.; Weldon, R.; Anderson, D.; Wyrobek, A.J. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum. Reprod.* 2006, 22, 180–187, Epub 19 October 2006.
42. Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction* 2011;(26)7:1628–1640.
43. Lv, M. Q. et al. Temporal trends in semen concentration and count among 327 373 Chinese healthy men from 1981 to 2019: a systematic review. *Human reproduction (Oxford, England)* 36, 1751–1775 (2021).
44. Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH et al. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human Reproduction Update* 2007(13);163-74.
45. Liu J, Tsai YL, Katz E et al. Outcome of in-vitro culture of fresh and frozen thawed human testicular spermatozoa. *Human Reproduction* 1997;(12) 8:1667–72.
46. Konc J, Kany´ K, Cseh S. The effect of condition/state of testicular spermatozoa injected to the outcome of TESE/ICSI-ET cycles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2008;(141,)1:39–43.
47. Nuñez Calonge R, Cortes S, Gago M et al. Increased Fertilization Rates after In Vitro Culture of Frozen-Thawed Testicular Immotile Sperm in Nonobstructive Azoospermic Patients. *SRN Urology* 2012;(2011), Article 108576.





ES-NONF-00230