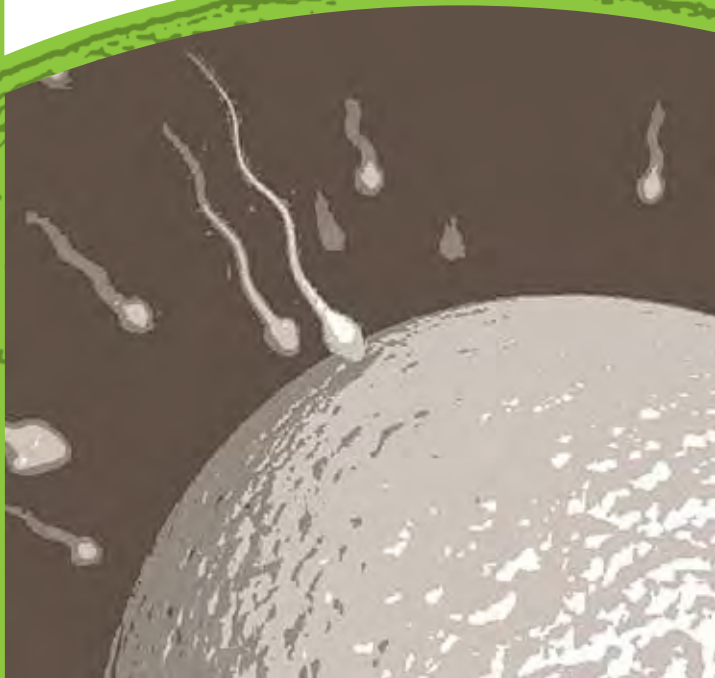




Manual de Estudio Seminal para Ginecólogos

Rocío Núñez Calonge
Pedro Caballero Peregrín



© 2013, Rocío Núñez Calonge y Pedro Caballero Peregrín

Coordinación Editorial:
Imago Concept & Image Development, S.L.
Rosa de Lima, 1, Oficina 105
28290 Las Matas (Madrid)

Reservados todos los derechos. No se puede reproducir ninguna parte de esta publicación, ni ser almacenada en un sistema de recuperación o transmitida en forma alguna por medio de cualquier procedimiento ya sea electrónico, mecánico o de otra índole, sin la previa autorización por escrito de los propietarios del copyright.

Los autores agradecen a Merck, S.L. su colaboración para la publicación de este manual.

Esta publicación se presenta como un servicio de información científica a la profesión médica. Los contenidos y opiniones elaborados por los diferentes autores son propiedad de éstos, y no son, ni representan necesariamente la opinión de Merck, S.L. Algunas de las referencias podrían citar medicamentos no comercializados así como información no acorde en su totalidad con lo contenido en la Ficha Técnica aprobada por las Autoridades Sanitarias, por lo que aconsejamos y recomendamos su consulta.

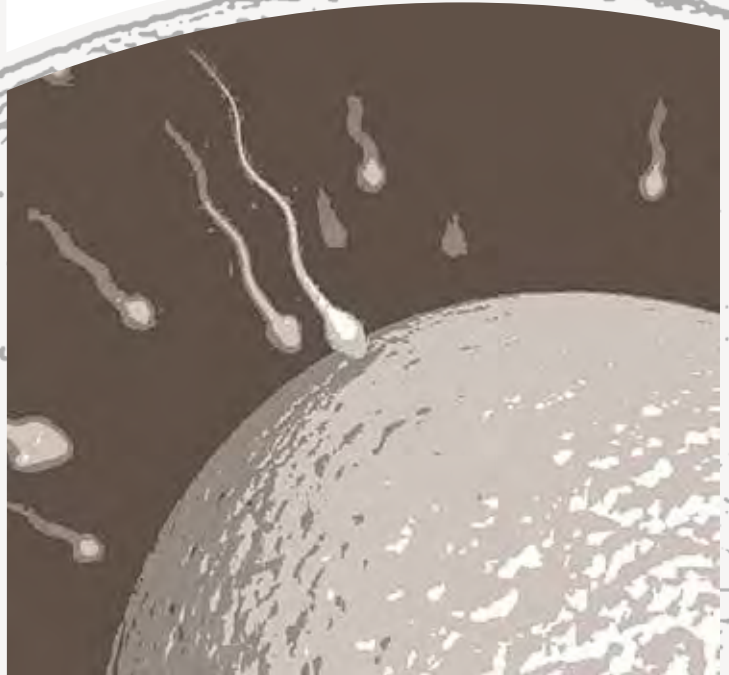
ISBN: xxxxxxxxxx
Depósito Legal: xxxxxxxx
Impreso en España

La edición del presente libro ha sido realizada con el patrocinio de Merck Serono



Manual de Estudio Seminal para Ginecólogos

Rocío Núñez Calonge
Pedro Caballero Peregrín



Índice

1. Introducción: para qué sirve esta guía	3
2. El varón en la consulta del ginecólogo: ¿Qué se le pide inicialmente?	5
3. Interpretación del análisis básico de semen. Qué hacer en los siguientes casos:	8
Azoospermia y OATz severa	10
Astenozoospermia severa y/o necrozoospermia	12
Teratozoospermia severa	13
4. Recuperación de espermatozoides móviles.....	15
5. Cuándo y cómo pedir un cultivo de semen	18
6. Eyaculación retrógrada	21
7. Cuándo realizar otras técnicas diagnósticas:	23
Estudio meiótico	24
FISH en espermatozoides	25
Microdelecciones del cromosoma Y	27
Fragmentación de ADN.....	28
8. Técnicas de selección espermática	31
MACS	32
IMSI	33
HBA.....	34
9. Terapias orales: el empleo de antioxidantes en infertilidad masculina.....	37
10. Recomendaciones prácticas: Cuándo congelar una muestra de semen	43
11. Manejo de espermatozoides testiculares.....	44

1

Introducción: para qué sirve esta guía

Cuando el ginecólogo se encuentra en la primera consulta de reproducción con una pareja, el estudio más inmediato que 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 ginecólogo es ¿debo pedirle otro análisis de semen? ¿qué pruebas 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?

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

Son muchos los manuales que existen sobre las pruebas que deben incluir 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 OMS¹, refiere pormenorizadamente cada uno de las pruebas necesarias en esta valoración. No obstante, al ginecólogo 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 ginecólogo cuando tiene que evaluar un estudio de semen en ausencia de un andrólogo, o cuando éste ya ha realizado un estudio previo y ha descartado una patología masculina, es decir: qué parámetros debe incluir un estudio de semen, cómo interpretar los resultados y cuál puede ser la terapia más adecuada en cada caso.

2

Primera consulta: el varón en la consulta del ginecólogo

El análisis básico de semen es la prueba necesaria y obligatoria 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 al ginecólogo.

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 espermática². 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 antes de realizar la técnica de reproducción asistida de elección.

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

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

Tabla I. Estudio básico del varón

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 II).

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

Tabla II. Cuestionario necesario en el seminograma

¿Cómo pueden interferir en los resultados estos datos?

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 dar lugar a confusión si existe una astenozoospermia.

Pérdida de alguna fracción: 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 (donde se encuentra la mayor parte del contenido espermático), 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.

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.

Ultimo 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: determinados medicamentos, como los antipsicóticos o determinados antibióticos, pueden alterar la calidad del semen.

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

Interpretación del análisis básico del semen

3

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

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. Las alteraciones que se pueden encontrar se muestran en la Tabla III.

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 o vías seminales
	Hiperespermia: alteración prostática o vesicular
pH	Acido: pH < 7 puede significar agenesia de vesículas
	Básico: pH >8: demasiado tiempo desde la obtención de la muestra
Viscosidad	Demasiado alta dificulta la movilidad espermática
Leucocitos	> 6 leucocitos por campo de 40x puede ser síntoma de infección

Tabla III. Análisis macroscópico del eyaculado

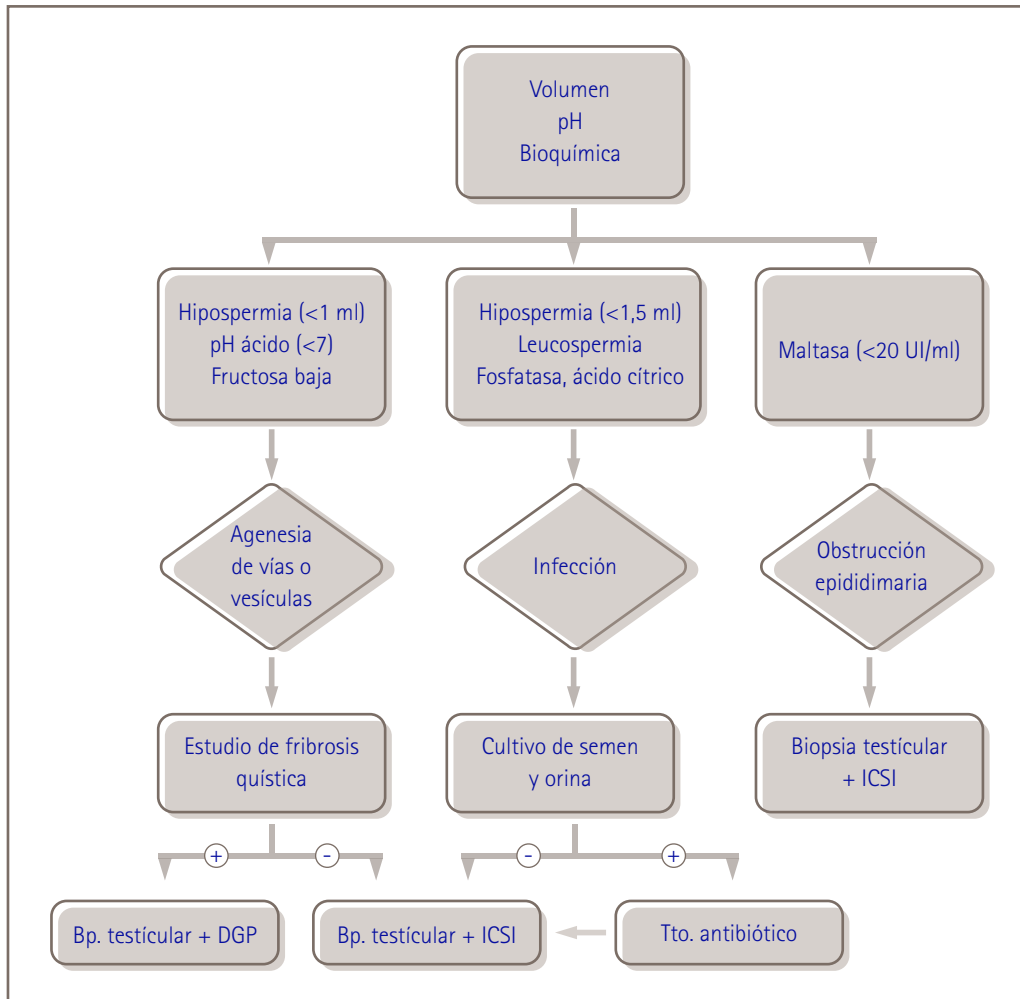
Los diagnósticos más claros de infertilidad masculina tras el seminograma son: azoospermia, oligoastenoteratozoospermia severa (OATz), astenozoospermia severa y teratozoospermia severa. En todos estos casos, la única técnica de reproducción asistida de elección sería la microinyección espermática (ICSI). Sin embargo, la observación detallada del análisis de semen en cada uno de estos casos, nos puede aportar información relevante que incluso puede hacernos cambiar el tratamiento.

Azoospermia y Oligoastenoteratozoospermia severa

En función de distintos parámetros alterados del seminograma, se puede sospechar si la azospermia u OATz es obstructiva o secretora. De esta forma, el abordaje de la misma puede ser diferente.

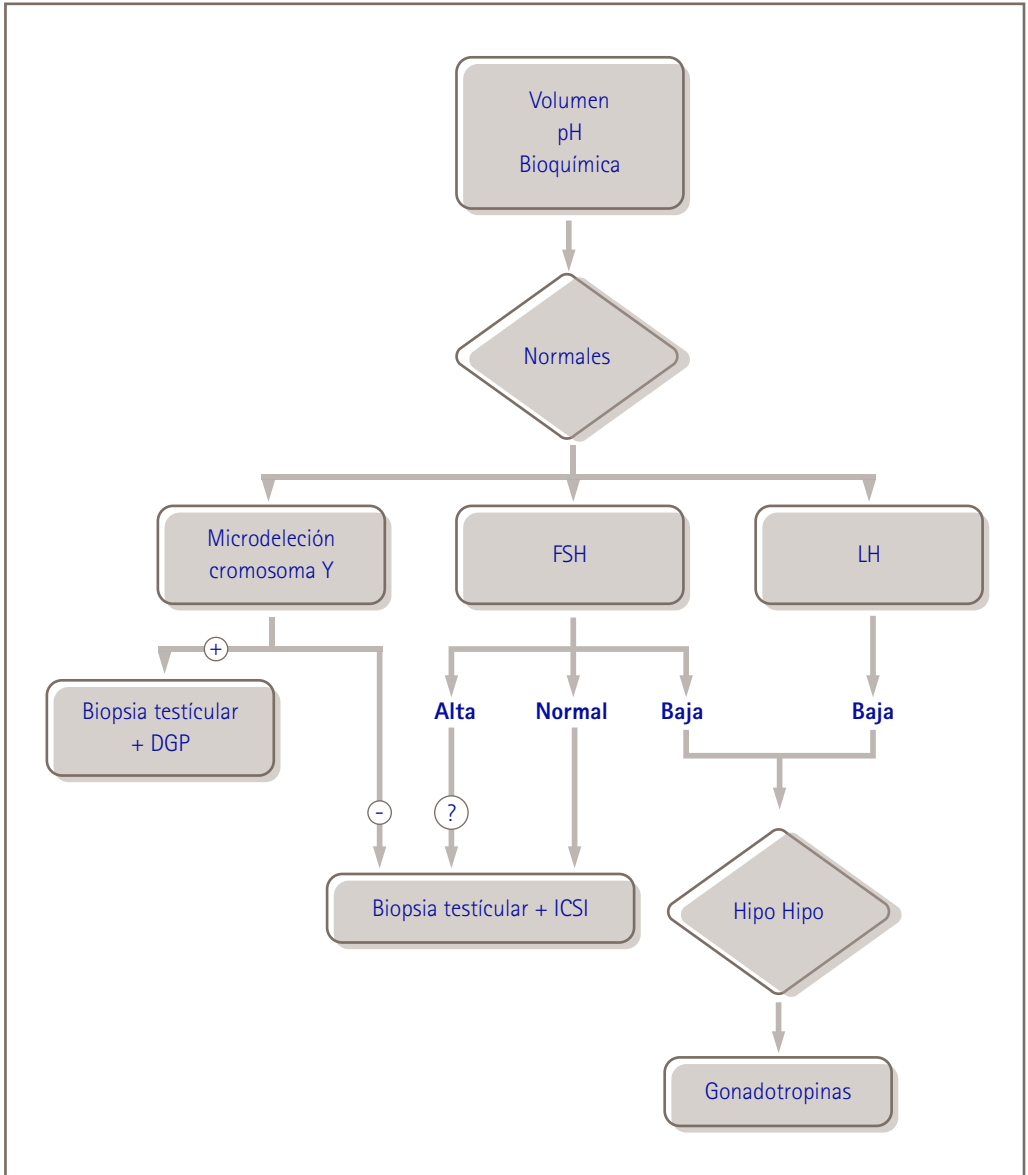
En el gráfico I se presentan las alteraciones que pueden presentarse en el análisis de semen en el caso de una **azoospermia u OATz obstructivas**.

Gráfico I. Flujograma en el caso de azoospermia u OATz obstructiva



La observación detallada de los parámetros seminales también nos puede orientar en el caso de la **azoospermia u OATz secretoras**, como se representa en el gráfico II.

Gráfico II. Flujograma en el caso de azoospermia u OATz secretora



Astenozoospermia severa

Otra de las causas claras de infertilidad masculina fácilmente detectables en el análisis de semen es la falta de movilidad espermática casi absoluta. En este caso, es importante poder distinguir si además de falta de movilidad existe una necrozoospermia (más del 75% de los espermatozoides sin vitalidad).

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

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 astenozoospermias se resumen en la tabla IV:

Factores ambientales	Recogida de la muestra inadecuada	Obtención de la muestra en el centro
	Tiempo de transporte	
	Causas exógenas o medioambientales (tabaco, alcohol, aumento t ^º escrotal)	Terapia antioxidantes orales
Infecciones	Con presencia o no de leucospermia	Terapia antibiótica
Genéticas	Síndrome cilios inmóviles u otros	DGP
Inmunológicas	Presencia de anticuerpos antiespermatozoides	ICSI

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

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^{5,6}, mientras que otros autores no encuentran ninguna correlación. Sin embargo, las evidencias en largas series de FIV, sugieren que la morfología de acuerdo al criterio estricto proporciona una información pronóstica importante sobre la tasa de fecundación⁷.

Es reconocido que un porcentaje de espermatozoides morfológicamente anómalos de más del 98% en un eyaculado, tiene efectos negativos sobre la tasa de gestación⁸.

La teratozoospermia puede encontrarse de forma aislada al analizar un eyaculado, de forma que el resto de los parámetros básicos (concentración y movilidad) sean normales⁹.

Figura 1. Espermatozoide morfológicamente anómalo, con 2 flagelos



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 asociada¹⁰.

En los casos de 100% de formas normales, existe un mayor potencial de aumento de aneuploidias, 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)¹¹.

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

Tabla V. Técnica recomendada en función del porcentaje de morfoanomalías espermáticas



Figura 2. Espermatozoide morfológicamente anómalo, con 2 cabezas

4

Recuperación de espermatozoides móviles

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 disminuya considerablemente la movilidad y viabilidad¹². 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*¹³.

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 capacitación 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 las fisiológicas con la retirada del plasma seminal y resuspensión de 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 fertilizar un ovocito.

¿Qué le interesa al ginecólogo conocer del R.E.M?

Cuando el ginecólogo se encuentra un informe con los datos de recuperación de espermatozoides móviles, lo que más le interesa es conocer la cifra final de espermatozoides móviles, bien por mililitro o en el total del volumen empleado. Ya son conocidas las cifras aceptadas para la realización de una u otra técnica:

En inseminación artificial intrauterina, el número mínimo más o menos estandarizado que se requiere es de 5-6 millones de espermatozoides móviles (con movilidad tipo a+b) por ml. Por debajo de estas cifras, el porcentaje de gestación baja considerablemente.

En el caso de fecundación in vitro, el número de espermatozoides móviles necesario baja un poco, aunque no demasiado: entre 2 y 3 millones de espermatozoides móviles por ml. Cifras por debajo de las anteriores son susceptibles de realizar microinyección intracitoplasmática (ICSI).

Además, hay que recordar los siguientes factores, además del REM para la elección de la TRA más adecuada:

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

Tabla VI. Técnica de Reproducción Asistida indicada en función del número de espermatozoides móviles recuperados (REM), supervivencia espermática a las 24 horas y morfoanomalías

Se pueden encontrar REM bajos en muestras normozoospermicas que indican alguna patología seminal.

Es aconsejable, tras el REM, para cualquier TRA, utilizar la muestra de semen antes de una hora.

Figura 3. Recuperación de espermatozoides móviles mediante swim-up



Cuándo y cómo pedir un cultivo de semen

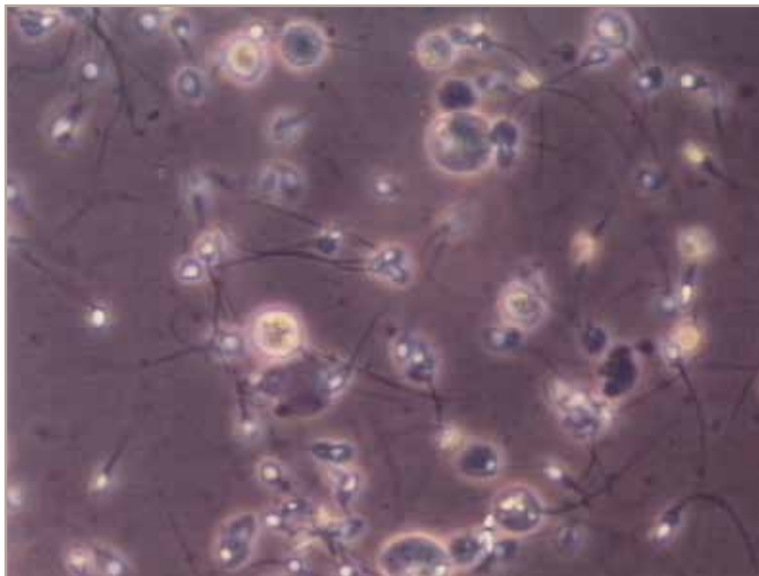
5

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 OMS¹.

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 procede¹⁴.

Figura 4. Muestra de semen con leucospermia



Cuándo pedir un cultivo de semen

Tabla VII

Cuando exista leucospermia (más de 6 leucocitos por campo de 40x)
Astenozoospermia severa (<20% movilidad total)
Aglutinación espermática
Hipospermia (<1,5 ml de volumen de semen)

Cómo pedir un cultivo de semen

Tabla VIII

Análisis microbiológico de orina (primera micción y micción media) y semen
Solicitar estudio de micoplasmas
Realizar antibiograma si procede





Figura 5. Espermatozoide incubado con Ureaplasma urealyticum durante 24 horas: colonias unidas al flagelo y cabeza espermáticas (Microscopía electrónica de scanning: 6000 x)

Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, Meseguer MA Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. Hum Reprod 1998;13(10):2756-61.¹⁴

6

Eyacuación retrógrada

La ausencia de eyacuación o aspermia, puede hacer sospechar la existencia de una eyacuación retrógrada de forma que el eyaculado ingresa en la vejiga en lugar de salir por la uretra. Consiste en el reflujo de los espermatozoides hacia la vejiga de la orina tras un estímulo sexual. El origen puede ser diverso (cirugías, diabetes, etc.).

Aunque es infrecuente, y normalmente el varón ya ha sido diagnosticado por el urólogo, es necesario conocer el manejo de la misma en la consulta de reproducción con el fin de poder conseguir los espermatozoides.

Para recoger los espermatozoides en los varones con eyacuación retrógrada se procede de la siguiente manera:

- ❑ Lo primero que hay que hacer es alcalinizar el pH de la orina, que es de donde se van a aislar los espermatozoides. 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. Y el día de la recogida deberá tomar dos cucharadas de bicarbonato dos horas antes de la masturbación.
- ❑ Para la recogida de la muestra se procede de la siguiente forma: orinar una hora antes de la recogida de la orina postmasturbación y desechar esa orina. Posteriormente, tiene que recoger la orina postmasturbación en un frasco estéril. Si existe eyaculado recogerlo en un bote estéril previo a la orina.

- ❑ La orina así obtenida se procesa en el laboratorio con la técnica habitual de recuperación de espermatozoides móviles (dado que el volumen será alto, preferiblemente *swim-up* al inicio, con dos lavados, y posteriormente gradientes de densidad).

7

Cuándo realizar otras pruebas diagnósticas

Como ya se comentó al inicio, en muchas ocasiones el ginecólogo no sabe discernir cuál es la prueba diagnóstica más idónea (al margen del seminograma), que debe solicitar al varón en estudio de infertilidad. Por eso, también muchas veces, la tendencia es realizar cuantas más mejor, de forma que tengamos más información sobre el diagnóstico de infertilidad masculina.

El problema se origina cuando, una vez se ha encontrado una alteración o el resultado está en el límite de la normalidad, no se sabe cómo proceder, o no se puede acceder a un tratamiento para mejorar la calidad del eyaculado. Por ejemplo, si tras realizar un FISH de espermatozoides nos encontramos un porcentaje elevado de aneuploidias, pero no podemos realizar DGP (Diagnóstico Genético Preimplantacional), es absurdo requerir ese estudio.

A esto se añade las grandes controversias encontradas en la bibliografía respecto a la utilidad de los diferentes métodos diagnósticos existentes en la actualidad.

Por todo esto, es importante saber qué se le va a ofrecer al paciente en el caso de solicitar una prueba diagnóstica que posteriormente encontramos anómala.

Estudio meiótico

Uno de los mejores ejemplos sobre lo comentado anteriormente se refiere al estudio meiótico de los espermatozoides.

El estudio de la meiosis se basa en la valoración del proceso meiótico a través del análisis del comportamiento cromosómico durante la primera y segunda división meiótica en espermatoцитos testiculares.

Las anomalías meióticas son tanto más frecuentes cuanto peor es la calidad de semen. Las indicaciones iniciales eran: OATz severa, azoospermia secretora, aborto de repetición y fallo de implantación.

Sin embargo, el principal inconveniente del estudio meiótico radica en la necesidad de estudio en muestras de biopsia testicular y la dificultad de interpretación de sus resultados, ya que no es una técnica extendida en su uso. Dado además que su frecuencia no es demasiado alta (2%) en pacientes no azoospermicos, y existen pocos estudios que analizan su repercusión en la consecución de una gestación, **su estudio está solo recomendado en los casos de azoospermia no obstructiva¹⁵. En caso de bloqueo meiótico completo el tratamiento aconsejado es el DGP.**

FISH 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 de testículo.

Las indicaciones que muestra la bibliografía¹⁶ son prácticamente las mismas que en el estudio de meiosis: OATz severa, abortos de repetición y fallos de implantación.

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 a 1 millón por ml.

Uno de los problemas derivado del estudio del FISH radica también en la interpretación de los resultados, ya que cada laboratorio de estudio genético posee sus controles específicos, dificultando la estandarización.

Por otra parte, pacientes con un porcentaje de aneuploidias mayor que los controles y que no han optado por el DGP, han conseguido un embarazo normal, por lo que la realización de FISH en espermatozoides es así mismo motivo de controversia.

Por todo ello, se propone la realización de FISH en espermatozoides en los casos de parejas con aborto de repetición en las cuales se han excluido otras causas femeninas, o en fallos de implantación.

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 aneuploidias en un varón normozoospermico que en uno con OATz severa.

La verdadera utilidad del estudio de FISH en espermatozoides radica en los casos en los que la frecuencia de alteraciones cromosómicas es tan alta que la única opción válida es emplear semen de donante.

¿Meiosis o FISH en espermatozoides?

- ❑ El estudio de meiosis analiza el proceso biológico (Profase I meiótica), mientras que el FISH observa el resultado del mismo.
- ❑ El estudio de meiosis obtiene como resultado una visión de conjunto del proceso, mientras que el FISH es un estudio específico, aunque limitado a las sondas utilizadas.
- ❑ El FISH analiza la muestra de espermatozoides, mientras que la meiosis analiza células precursoras diploides.

Pero, ¿cuándo utilizar una u otra técnica diagnóstica?

Técnica	Indicación	Tratamiento
Meiosis	Azoospermia secretora	DGP con espermatozoides de testículo
FISH	Aborto de repetición Fallo de implantación	DGP o semen de donante

Tabla IX. Indicaciones y tratamiento en los estudios de Meiosis y FISH

Microdelección del cromosoma Y

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

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

Las indicaciones para el estudio de microdeleciones cromosoma Y son la azoospermia secretora y OATz severas¹⁷.

Si la deleción está en regiones AZFa y/o AZFb existe una alta probabilidad de no existir 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 hijos varones. Ante la presencia de este defecto, se recomienda DGP o realización de ICSI con consejo genético.

Otro aspecto a 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 tiempo¹⁸.

Tratamiento en función de la Microdelección del cromosoma Y

AZFa AZFb	Posible ausencia de espermatogénesis	Semen de Banco
AZFc	Si hay espermatozoides: transmisión a hijos varones	DGP o ICSI con consejo genético

Tabla X

Fragmentación de ADN

El estudio de fragmentación se basa en la detección de roturas en la molécula de ADN de los espermatozoides.

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 las discrepancias de criterio en cuanto a su utilidad se deben principalmente a las diferentes técnicas de estudio existente, lo que dificulta la estandarización de los resultados, y a la confusión sobre su diferente etiología (ambiental o intrínseca al varón), lo que lleva diferentes interpretaciones^{19,20}.

En cualquier caso, aunque no esté del todo clara la relación entre el aumento del porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentados y resultados clínicos en las técnicas de reproducción asistida, sí es cierto que...

...el porcentaje de fragmentación de ADN es mayor en varones infértiles que en controles fértiles.

El aumento del índice de fragmentación es el resultado de una serie de eventos tales como una espermatogénesis anómala como consecuencia de la presencia de roturas de ADN no reparadas durante el proceso de remodelación de la cromatina, o la agresión espermática por efecto medioambiental, como el estrés oxidativo o el daño iatrogénico. Otras causas que pueden aumentar el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado son las infecciones, por aumento del estrés oxidativo o anomalías cromosómicas.

En consecuencia, dependiendo de la etiología de la fragmentación, así será el método de tratamiento propuesto.

Existe un consenso respecto al punto de corte, considerando un índice de fragmentación patológico por encima de un 30%.

¿Cuándo realizar el estudio de fragmentación de ADN?

Tabla XI

Oligoastenoteratozoospermia severa
Fallo de implantación
Aborto de repetición
Muestras de semen congeladas (previa quimio/radioterapia; donación de ovocitos)
Edad del varón avanzada

En la siguiente tabla se presentan las propuestas más conocidas sobre la actuación frente al aumento del índice de fragmentación (IF):

Método propuesto	Comentario
Utilización de espermatozoides testiculares	No hay muchas publicaciones. De utilidad solo en el caso de alteraciones post testiculares.
Tratamiento antibiótico	Si el aumento del IF se debe a una infección.
Antioxidantes	Cuando el IF está asociado a estrés oxidativo.
Baja abstinencia sexual	En el caso de normozoospermias e ICSI.
Congelación muestras de semen con menor IF	Repetir el estudio y congelar las muestras con menor IF*.

Tabla XII. Métodos propuestos para rebajar el índice de fragmentación de ADN espermático

Es importante destacar la variabilidad intraindividuo existente en la determinación del índice de fragmentación. Se ha demostrado que en pacientes con OATz incluso moderada, la variabilidad intraindividuo es igual a la existente entre distintos pacientes, no así en varones normozoospermicos²¹.

Por eso, en pacientes con alteraciones en la calidad de semen que se realice estudio de fragmentación, se recomienda repetirlo para confirmar resultado, y si es patológico, criopreservar la muestra con mejor IF.

El "Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine" (ASRM), en su última guía ha publicado la recomendación de no realizar de forma rutinaria la prueba de fragmentación de ADN²².

8

Técnicas de selección espermática

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 que en los últimos años se han desarrollado varios métodos de selección espermática con el objetivo de mejorar los protocolos de preparación de semen para reproducción asistida. Estos métodos permiten la selección de espermatozoides maduros, no apoptóticos y con el ADN intacto. Los más utilizados son: MACS (*magnetic-activated cell sorting system*), IMSI (*intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) y selección basada en la unión al ácido hialurónico (HBA).

Selección mediante columnas de anexina (MACS): selección de espermatozoides no apoptóticos

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.

Así mismo, se ha demostrado que su empleo disminuye el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado²³.

Las ventajas e inconvenientes de las MACS son:

Ventajas	Inconvenientes
Selección de muestras de semen con bajo IF	Pérdida del número de espermatozoides por sucesivos lavados: no se puede utilizar en muestras con OATz severa.
Fácil manejo	Posibilidad de presencia de microbeads en la muestra.
Barato	No está confirmada la acción del campo magnético en los espermatozoides.

Tabla XIII

Selección mediante IMSI: selección mediante ultramorfología

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 aumentos²⁴. 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 cromatina²⁵. 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 OATz utilizando IMSI frente al ICSI convencional, aunque sin diferencias en la tasa de fecundación y calidad embrionaria²⁶.

Sin embargo, existen estudios que refieren la no existencia 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 gestación²⁷.

Ventajas e inconvenientes de la utilización del IMSI en la selección espermática:

Tabla XIV

Ventajas	Inconvenientes
Selección de espermatozoides morfológicamente normales	Selección de espermatozoides morfológicamente normales.
	No hay clara asociación con aumento de la tasa de gestación.
	Demasiado tiempo para la búsqueda espermática que puede ser lesivo para los espermatozoides en PVP y/o para los ovocitos.
	Muy caro.
	Falta de subjetividad en la selección.
	Necesita personal especializado.

Selección mediante HBA: selección de espermatozoides maduros

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 maduros²⁸.

Con este fin, se ha desarrollado un dispositivo llamado placa de PIC-SI, con la cual se seleccionan espermatozoides que han completado la remodelación de la membrana plasmática, la extrusión citoplas-

mática y la maduración nuclear, teóricamente con menos índice de fragmentación de ADN²⁹.

Basándose en este principio, también se ha comercializado un medio de selección espermática, el SpermSlow™, 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 espermatozoides³⁰.

Existen algunas publicaciones que asocian la madurez espermática con la fragmentación de ADN³¹ y con la menor frecuencia de aneuploidias en los espermatozoides maduros. Sin embargo, hay pocos estudios que correlacionen este método de selección espermática con la tasa de gestación en ICSI³².

Ventajas e inconvenientes de la utilización del HBA en la selección espermática:

Tabla XV

Ventajas	Inconvenientes
Selección de espermatozoides maduros	No hay suficientes evidencias científicas que apoyen la mejora de resultados.
Método fácil y barato	Necesita personal especializado.

Pero, ¿cuándo utilizar uno u otro método de selección?

Técnica	Indicación
MACS	Alto índice de fragmentación en muestras normozoospermicas u OAT leves.
IMSI	100% morfoanomalías espermáticas. (¿)
HBA	Selección de espermatozoides para ICSI en casos de pacientes con alto IF y OATz severa.

Tabla XVI

En conclusión: Aún a pesar de saber que un alto índice de fragmentación espermática afecta negativamente a la posibilidad de conseguir una gestación,...

...no existe un método seguro, fiable y contrastado para seleccionar muestras de semen con bajo índice de fragmentación, y menos aún, para conocer como es el ADN del espermatozoide que se emplea para ICSI. Sin embargo, se pueden aplicar diferentes estrategias, incluso al mismo tiempo, con el fin de disminuir esta incidencia.

Estrategias para disminuir el índice de fragmentación de ADN en espermatozoides
En varones normozoospermicos que van a realizar ICSI, se les puede indicar que no tengan abstinencia sexual previa.
Procesar las muestras de semen del modo habitual (swim-up, gradientes), minimizando el tiempo de incubación.
Si la muestra de semen tiene un alto índice de fragmentación y es normozoospermica u OAT moderada, utilizar MACS.
Posteriormente, se puede combinar con el uso de Sperm-slow para seleccionar los espermatozoides a microinyectar.

Tabla XVII. Estrategias para disminuir el índice de fragmentación de ADN en espermatozoides

9

Terapias orales: empleo de antioxidantes

En los últimos años se han llevado a cabo muchos estudios sobre el efecto del estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno (ROS), y las terapias antioxidantes en el sistema reproductivo del varón³³. En condiciones fisiológicas, los espermatozoides producen pequeñas cantidades de ROS, que son necesarias para la fecundación, la reacción acrosómica y la capacitación. Sin embargo, si aumenta la producción de ROS y no está asociada con un incremento similar en los sistemas antioxidantes, tiene lugar el daño peroxidativo a la membrana plasmática y la pérdida de integridad nuclear, que conduce a la muerte celular y disminución de la fertilidad. Además, 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.

The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. Gharagozloo P and Aitken RJ. Human Reproduction 2011; 26(7):1628-40³⁴



Es difícil obtener una conclusión definitiva respecto al beneficio de estas terapias, ya que la mayoría de los estudios carecen de grupos control, se emplean diferentes antioxidantes con diferentes combinaciones o dosis, y no se evalúa la tasa de gestación en parejas infértiles.



Aún a pesar de que se han publicado numerosos artículos sobre los beneficios de la terapia con antioxidantes se necesitan más estudios para conocer los verdaderos efectos de la misma en la infertilidad masculina.

The Cochrane Library 2011, Volumen 8

El 30-80% de los casos de subfertilidad masculina se debe a los efectos perjudiciales del estrés oxidativo sobre el esperma. La administración oral de antioxidantes podría mejorar la calidad del esperma al reducir el estrés oxidativo. La revisión Cochrane incluye 34 estudios clínicos con 2.876 parejas en total³⁵.



Nacidos vivos: tres ensayos informan nacidos vivos. Los hombres que toman antioxidantes tienen un incremento estadísticamente significativo asociado a la tasa de nacidos vivos (odds ratio 4,85; intervalo de confianza al 95%: 1,92-12,24; $p=0,0008$, $I^2 = 0\%$) en comparación con el grupo control. Estos resultados se basan en 20 nacidos vivos de un total de 214 parejas en solo tres estudios.

Tasa de embarazo: hubo 96 embarazos en 15 estudios con un total de 964 parejas. El uso de antioxidantes se asoció a un aumento de la tasa de embarazos estadísticamente significativo en comparación con el grupo control. (odds ratio 4,18; intervalo de confianza al 95%: 2,65-6,59; $p < 0,00001$; $I^2 = 0\%$).

Tasa de embarazo: hubo 96 embarazos en 15 estudios con un total de 964 parejas. El uso de antioxidantes se asoció a un aumento de la tasa de embarazos estadísticamente significativo en comparación con el grupo control. (odds ratio 4,18; intervalo de confianza al 95%: 2,65-6,59; $p < 0,00001$; $I^2 = 0\%$).

Efectos secundarios: ningún estudio ha manifestado pruebas de efectos secundarios perjudiciales con el uso de antioxidantes.

Por una parte, existe el problema de cómo medir el daño oxidativo en el varón. En cuanto método, una de las técnicas más extendidas y estandarizadas de medir el daño espermático es la valoración del grado de fragmentación de su ADN. Uno de los productos de esta fragmentación es la 8-OH-desoxiguanina, considerado como uno de los marcadores más fiables de destrucción de ADN³⁵. Sin embargo, esta determinación es difícil realizarla de rutina. El siguiente inconveniente es poder conocer si el aumento en el índice de fragmentación de ADN es debido a estrés oxidativo o a otros factores.

Estos inconvenientes dificultan la contestación de estas dos preguntas: ¿cuándo realizar la terapia con antioxidantes? y ¿cuál sería la más idónea?

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).

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-dihidrotestosterona³⁶

Zinc

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 (). La forma reducida de CoQ10, el ubiquinol, también actúa como antioxidante, impidiendo la peroxidación de lípidos. 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 espermática³⁵.

Coenzima Q10

La L-carnitina es un antioxidante de la dieta que disminuye las ROS al eliminar el acetil-CoA extracelular tóxico responsable de las ROS mitocondriales³⁶. 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.

L-carnitina

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, alimentación que en las últimas décadas descendió notablemente. 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 espermática³⁵.

Otros compuestos, como el ácido aspártico, también son empleados en la formulación de los antioxidantes, aunque no actúe como tal.

Ácido D-aspártico

El ácido D-aspártico (D-Asp) es un aminoácido endógeno con función neuroendocrina que se encuentra principalmente en la hipófisis y en los testículos, y juega un papel fundamental en la regulación, liberación y síntesis de LH y de testosterona³⁷.

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 oligoastenoteratospérmicos³⁷.

Resumen del uso de antioxidantes en infertilidad masculina:

- ❑ Aunque no se conoce su acción específica, está demostrada la eficacia de su utilización en varones infértiles.
- ❑ Indicado en varones con OATz o Astenozoospermia idiopáticas o alto índice de fragmentación espermática.
- ❑ Mínimo dos meses de terapia (tener en cuenta el ciclo de espermatogénesis).
- ❑ El compuesto utilizado debe contener, **como mínimo, zinc y coenzima Q10.**

10

Recomendaciones prácticas

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.

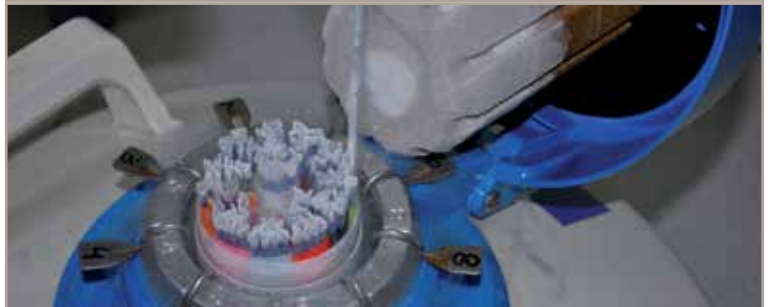
Aunque actualmente existe la opción de vitrificar los ovocitos el día de la punción, la posibilidad de que el varón no pueda obtener la muestra de semen o no se encuentren espermatozoides, es ciertamente estresante para la pareja y, sobre todo, para él mismo. Por ello, como medida de prevención, es recomendable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



Manejo de espermatozoides testiculares



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 testículo³⁸.

Sin embargo, los datos publicados comparando resultados de ICSI con espermatozoides de testículo frescos frente a congelados, son motivo de controversia³⁹. 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.

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 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 ciclos⁴⁰.

- ❑ 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. En el testículo, los espermatozoides todavía no han alcanzado la capacidad de movilidad, por lo que, después de una TESA 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.

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

Siempre que se realice una TESA 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.

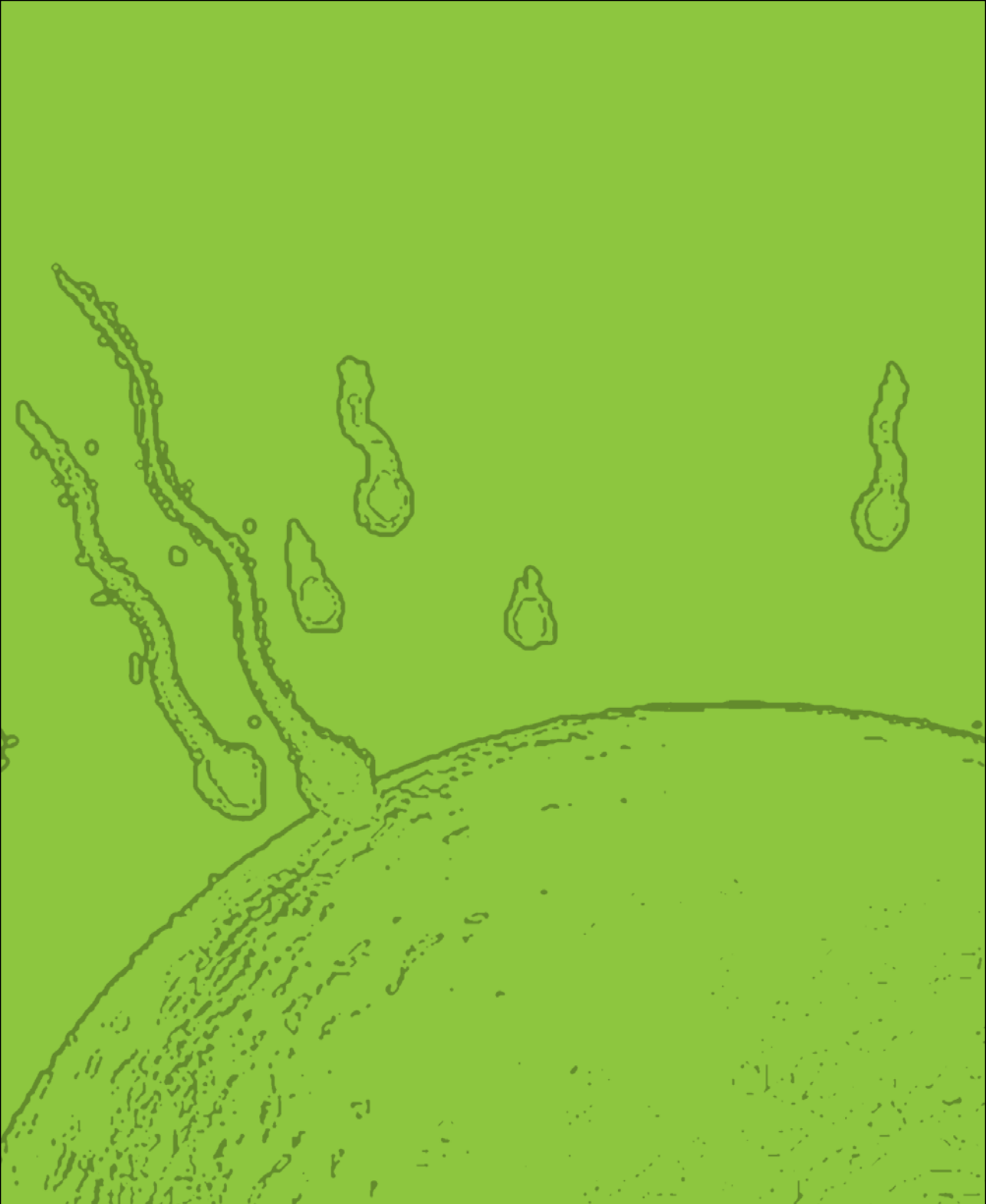


Bibliografía

1. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth Edition, 2010, World Health Organization.
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. Balleascà 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. Sercchioli 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. Zini A, Philips M, Courchesne A et al. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2009;(91)6:2495-500.
9. TroLoudes DM et al. Pregnancy with spermatozoa from a globozoospermic man after intraytoplasmic sperm injection treatment. *Human Reprod* 1995;(10)4: 880-2.
10. Natali I, Muratori M, Sarli V, Vannuccini M, Cipriani S, Niccoli L, Giachini C. Scoring human sperm morphology using Testsimplets and Diff-Quik slides. *Fertil Steril*. 2013 Apr;99(5):1227-1232
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Vozdova M, Heracek J, Sobotka S et al. Testicular sperm aneuploidy in non-observative azoospermic patients. *Human Reproduction* 2012;(27)7:2233-9.

16. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I *et al.* Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;(76)3:479-84.
17. 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.
18. 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 microdelección de la región AZFc del cromosoma Y. *Rev Int Androl* 2007;5(3).
19. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanism of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;(93):1027-36.
20. Simon L, Proutski I, Stevenson M *et al.* Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 2013;(26)1:68-78.
21. Nuñez-Calonge R, Cortes S, Ortega L *et al.* Intra- individual variations in sperm DNA fragmentation in men from infertile couples compared with fertile sperm donors. *Reproductive BioMedicine Online* 2012;(24)1:S1-S4.
22. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertility and Sterility* 2013;(99)3.
23. Rawe VY, Boudri HU, Sedo CA *et al.* Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2010;(20):320-3.
24. 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
25. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F *et al.* Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002;(23):1-8.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E *et al.* Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;(84):1665-1673.
30. Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D *et al.* Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online* 2009;(19)3:35-43.
31. Vozdova M, Kasikova K, Oracova E *et al.* The effect of the swim-up and hyaluronan-binding methods on the frequency of abnormal spermatozoa detected by FISH and SCSA in carriers of balanced chromosomal translocations. *Hum Reprod* 2012; (27)3:930-7.

32. Van Den Bergh MJ, Fahy-Deshe M, Hohl MK. Pronuclear zygote score following intracytoplasmic injection of hyaluronan-bound spermatozoa: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2009;(19):796–801.
33. Dosh S, Khullar K, Sharma, R *et al.* Role of reactive nitrogen species in male Infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012;(10):109.
34. 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
35. Showell MC, Brown J, Yazdani A *et al.* Antioxidants for male subfertility. *The Cochrane Library* 2011;(8).
36. 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.
37. D'Aniello G, Ronsini S, Guida F *et al.* Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: Possible role in reproduction. *Fertil Steril* 2005;(84)5:55–9.
38. 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.
39. 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.
40. 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.



Con la colaboración de:

Avalado por:

ASEBIR
Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción



MerckSerono

Merck Serono is a
division of Merck

MERCK
Living Innovation