



**“Estrategias de selección  
espermática en humanos: impacto  
en la calidad del ADN y en el éxito  
reproductivo.”**

**Memoria presentada por el Licenciado en Medicina  
PASCUAL SÁNCHEZ MARTÍN  
para optar al grado de Doctor.**

**Sevilla, 2018.**



## LOS DIRECTORES DE LA TESIS

**Fdo. Dr. JAIME GOSÁLVEZ BERENGUER**  
Catedrático  
Departamento de Genética  
Universidad Complutense de Madrid.

**Fdo. Dr. FERNANDO SÁNCHEZ MARTÍN**  
Doctor en Ginecología  
Responsable del Área de Reproducción Asistida  
de Clínicas Ginemed.

**Fdo. El doctorando PASCUAL SÁNCHEZ MARTÍN.**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 LA DIVERSIDAD GAMÉTICA: ¿UN ÉXITO REPRODUCTIVO SIN RETORNO?.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA: ¿UNA SUBVERSIÓN DE LA REPRODUCCIÓN NATURAL? .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 SELECCIÓN ESPERMÁTICA EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.1 VALORACIÓN DEL VARÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3.2 ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA DIRECTAS.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.3 ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA INDIRECTAS.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4 LA CALIDAD DEL ADN Y LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA.....</b>	<b>36</b>
<b>2 HIPÓTESIS.....</b>	<b>40</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
<b>4. RESUMEN RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>68</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA. ....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO I:</b>	
<b>8.1 ARTÍCULO I: “Increased pregnancy after reduced male abstinence.” Sánchez-Martín et al., 2013. ....</b>	<b>81</b>
<b>8.2 ARTÍCULO II: “Seminal quality in the first fraction of ejaculate”. Hebles et al., 2015. ....</b>	<b>88</b>
<b>8.3 ARTÍCULO: “Comparación del resultado reproductivo de microinyecciones de espermatozoides intracitoplásmicos en hombres oligozoospermicos con “Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with</b>	

*ejaculated and testicular sperm*". Esteves *et al.*, 2015. ....

**93**

**8.4 ARTÍCULO:** "Magnetic cell sorting of semen containing spermatozoa with high DNA fragmentation in ICSI cycles decreases miscarriage rate.") Sánchez-Martín *et al.*, 2017. .... **101**

**8.5 ARTÍCULO:** "Sperm DNA fragmentation in donors and normozoospermic patients attending for a first spermiogram: Static and dynamic assessment." Tvrdá *et al.*, 2018. .... **108**

## **ABREVIATURAS**

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

DFI: *DNA Fragmentation Index* (Índice de fragmentación del ADN).

FIV : Fecundación *In Vitro*.

ICSI: *Intracytoplasmic Sperm Injection* (Inyección Intracitoplasmática de esperma).

IMSI: Inyección intra-citoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados.

MACS: *Magnetic Activated Cell Sorting* (Selección Celular activada magnéticamente).

PICSI: *Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection* (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides Fisiológicos).

PVP: Polivinilpirrolidona .

RCD: *Rate Combined Damage* (Tasa de Daño Combinado).

REM : Recuento de Espermatozoides Móviles.

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida.

**Resumen Tesis Doctoral “ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA  
EN HUMANOS: IMPACTO EN LA CALIDAD DEL ADN Y EN EL ÉXITO  
REPRODUCTIVO.” presentada por Pascual Sánchez Martín**

El objetivo de esta Tesis Doctoral es determinar qué estrategias muestran mayor eficacia para seleccionar en una muestra seminal al espermatozoide más adecuado que permita el éxito clínico en los tratamientos de reproducción asistida en parejas estériles por un factor masculino. De este modo se pretende que la evidencia empírica, desde la aplicación del método científico, permita esclarecer si los protocolos del Médico en la consulta como los del Andrólogo en el laboratorio son los más apropiados y eficientes para lograr el éxito en las Técnicas de Reproducción Asistida.

En cada uno de los bloques abordados a través de las publicaciones presentadas se persigue lograr una mejora en la selección espermática.

Por un lado en esta Tesis se ha llevado a cabo la demostración empírica de mejoras en los protocolos de recogida de muestra seminal (Sánchez-Martín *et al.*, 2013; Hebles *et al.*, 2015) para ser implementados en la práctica clínica y lograr un mayor éxito en las técnicas de reproducción asistida. Se han realizado también estudios comparativos de la integridad del ADN en la calidad seminal de los espermatozoides testiculares (extraídos directamente del testículo) frente a aquellos recogidos a través de la eyaculación (Esteves *et al.*, 2015). Y por último se han realizado estudios para la mejora de los protocolos de procesamiento en el laboratorio en cuanto a la fragmentación del ADN espermático (Sánchez-Martín *et al.*, 2017) y de su velocidad de degradación tras la recogida de la muestra seminal (Tvrdá *et al.*, 2018) para determinar cuál debe ser el tiempo máximo de espera para procesar una muestra antes de que se vea afectada notablemente su calidad. Además estos datos obtenidos han permitido determinar nuevos parámetros que pueden ser aplicados para clasificar a los donantes de semen según su potencial de fertilidad.

# **1. INTRODUCCIÓN**

# 1.1 LA DIVERSIDAD GAMÉTICA: ¿UN ÉXITO REPRODUCTIVO SIN RETORNO?.

La vida, como hoy la entendemos, comienza en la tierra hace aproximadamente 4000 millones de años. Si bien este cálculo es bastante especulativo, se considera que casi desde el comienzo de este complejo proceso, la evolución ha hecho ganar en complejidad a las formas vivas en búsqueda de una mayor eficiencia conjugando el binomio estructura-función para con ello asegurar la perpetuación de esas formas vivas (Bedau y Cleland, 2016). Los detalles del origen de la vida se desconocen, existiendo básicamente dos teorías que confluirían en un punto en común que es el origen del "*replicador*", entendido este como una molécula que sería capaz de realizar una copia de sí misma. Una de las teorías sobre el origen de la vida, conocida como la "*panspermia*", sugiere que la materia orgánica o incluso los primeros organismos vivos pudieron haber llegado del espacio (Lingam, 2016). Otra teoría, conocida como "*abiogénesis*", propugna, por el contrario, un origen terrestre planteando un surgimiento de la vida a partir de la materia inerte, como compuestos orgánicos, cuando se dieron las condiciones para que el vapor de agua pudiera condensarse por primera vez permitiendo la aparición de los primeros indicios de vida. En esta visión, la enorme energía que tenía un planeta joven, con el concurso de energías procedentes de los volcanes, rayos así como la existencias de radiación de diferente naturaleza, ayudaría a la formación de moléculas de cierta complejidad a partir de compuestos simples como son el metano y el amoniacó (García *et al.*, 2016). Posteriormente, estas moléculas reaccionarían aleatoriamente unas con otras hasta que se creó una nueva molécula clave, "*el replicador*", capaz de promover reacciones químicas encaminadas a realizar una copia de sí misma siendo capaz por lo tanto de reproducirse, dando origen a lo que hoy conocemos como vida.

La naturaleza de esta molécula permanece y posiblemente permanecerá desconocida. Las proteínas, por ejemplo, son compuestos esenciales en las formas de vida y los aminoácidos, sus elementos base, se pueden generar en el



laboratorio a partir de elementos más simples tras someterlos a descargas de energía en unas condiciones especiales. Los fosfolípidos, determinados carbohidratos o incluso los ácidos nucleicos, pudieron surgir también a partir de procesos similares. El “*replicador*” tenía capacidad de generar copias idénticas de sí mismo, pero a veces en alguna copia aparecía un error; si ese cambio no permitía generar nuevas copias, se bloqueaba y la molécula surgida desaparecía, pero si algún cambio dotaba a la molécula de una mejora en la réplica, la nueva variante molecular sería más numerosa y exitosa. Sea como fuere, el paso del tiempo seleccionó al actual “*replicador*” en la forma que hoy conocemos como ácido desoxirribonucleico (ADN). Es en esta molécula donde reside la información que evoluciona a través de un proceso de selección natural (Vasas *et al*, 2010).

Como hemos visto el concepto de vida es difícil de acotar, existiendo un límite difuso entre lo que consideramos como un ser vivo y lo que no; y no sólo eso, sino que no sabemos si comenzó una vez o pudo comenzar en varias ocasiones a lo largo del tiempo. Lo que sí sabemos es que la vida una vez creada tiende a perpetuarse y parte de la esencia de los organismos se transmitirá a su descendencia. Más sencillo de entender para nosotros es el concepto de organismo vivo o forma viva. Si el concepto general de vida prácticamente es inmortal, dado que se asocia a la materia y a su perpetuación a lo largo del tiempo, el concepto de organismo vivo es finito cuando lo asociamos a un ente vivo o a un individuo y resulta algo más duradero cuando lo asociamos al de especie. De hecho, el acervo genético -el genoma- que define la condición fenotípica de los individuos, es un patrimonio común y singular para los individuos que conforman cada especie y es tan duradero como el propio concepto de especie. Por lo tanto, cada individuo dentro de una especie, se perpetua de forma finita, pero dejará como herencia su patrimonio genético para afianzar la especie como un concepto de más amplia duración. En cierta forma, mientras que el individuo está condenado a extinguirse, la huella genómica perdurará de una generación a otra.

Volviendo a los individuos desde el punto de vista de la perpetuación, existen dos estrategias para mantener la herencia genética asociada a una especie: la inmortalidad o la auto-perpetuación. Hoy por hoy la posibilidad de

inmortalidad, exceptuando un escenario únicamente artificial en unas condiciones de laboratorio o “*in vitro*” en las que una línea celular concreta puede generarse y mantener su continuación, se reduce a mantener la carga genética de un individuo o especie mediante la auto-perpetuación; idea que se asocia de forma intuitiva al concepto de reproducción. Por lo tanto, la reproducción podría definirse como el proceso biológico que permite la creación de nuevos organismos a partir de los progenitores, asegurando la auto-perpetuación de la especie. Como tal, es una propiedad común de todas las formas de vida conocidas, puesto que la auto-perpetuación es una de las características implícitas al concepto de vida.

La reproducción comienza como un proceso fundamentado en hacer una copia igual a la anterior, siendo una reproducción de tipo asexual. Con esa estrategia de auto-perpetuación se logró un gran éxito evolutivo y que se extiende hasta la actualidad. Durante un periodo de aproximadamente 2500 millones de años la reproducción asexual fue la única existente, pero hace unos 1500 millones de años apareció una nueva forma de perpetuación alternativa, la reproducción sexual (Mark Ridley, 2004) Mendel's Daemon: Evolution and the Complexity of Life). El modo exacto en que apareció evidentemente no puede determinarse, pero se conoce la existencia de unos patrones muy generalistas y comunes para todas las especies; por ello la teoría que tienen mayor probabilidad de ser cierta es la propugnada por John Maynard Smith y conocida como la teoría *fagocitaria o canibalista*. Esta teoría se basa en una de las propiedades de las células eucariotas como es la capacidad de fusionarse entre sí, debido a las cualidades inherentes a la membrana citoplasmática de *fagocitar* elementos sencillos. Esta característica está presente incluso en organismos muy primitivos ya que nace con un sentido finalista, la alimentación. En la mayoría de las ocasiones los elementos que se fagocitaban eran pequeños nutrientes que se encontraban en el medio, pero con el tiempo este sistema se perfeccionó y llegó incluso a la fagocitosis de una célula entera. Como la función principal era nutricional, tras fagocitar la célula se producía la destrucción total de la célula fagocitada. Esta teoría propone que, cuando ocurría la fagocitosis, en ocasiones, tenía lugar la fusión de las dos células sin destrucción de los elementos esenciales, produciéndose un organismo unicelular en el que coexistían ambos núcleos; esta permanencia activa de ese segundo núcleo se mostró como una ventaja

adaptativa de estas células híbridas. Los estudios que realiza la geología nos muestra un ambiente muy diferente al actual en el inicio de la vida. En aquella atmósfera primitiva las proporciones de oxígeno molecular eran muy inferiores a las que existen en la actualidad, a la vez que la cantidad de radiación que afectaba a los organismos era mucho mayor. Este elevado nivel de radiación provocaba una altas tasa de mutación.

En este escenario primigenio en el que era frecuente la inactivación de algunos genes por una mutación en su secuencia, disponer de una dotación génica por duplicado tras un proceso de fagocitosis no destructiva suponía una ventaja adaptativa y, por tanto, le confería una mayor capacidad de supervivencia a los nuevos organismos. De este modo la selección natural potenciaba el éxito de la célula que tuviese dos núcleos (diploide), sobre las células que tenían un solo núcleo (haploides). Había nacido la célula diploide y con ello la posibilidad de que surgiera la reproducción sexual que requiere de la formación y posterior fusión de dos células haploides para formar una célula con una dotación genética doble.

En el inicio de la reproducción sexual, hace unos 1500 millones de años, los gametos eran de igual tamaño (isogamia), con lo cual no se podrían diferenciar células masculinas o femeninas. Por lo tanto, no existía diferenciación de sexos; tan sólo existía la reproducción entendida como una reducción de la carga genética en los gametos y la unión de dos de ellos para crear un nuevo individuo. Se debe imaginar los comienzos de este tipo de reproducción ubicado en un ambiente donde un ancestro marino isógamo lanzaría sus gametos al medio acuático, en donde tendrían que colisionar aleatoriamente y fusionarse para que ocurriera la fertilización (Maynard Smith, 2004).

La vida desde el origen de los organismos se debate entre dos extremos: gastar la energía en conservarse o gastar la energía en perpetuarse. Esto explica porque las especies que viven mucho tiempo gastan muchísima energía en conservarse, pues el tiempo siempre produce un deterioro de las formas iniciales, mientras que emplean menor energía en reproducirse. Por contra aquellas especies que se ven sometidas a un alto nivel estrés y su vida corre

peligro dedican una gran cantidad de energía en reproducirse para poder perpetuarse como especie; las ratas se reproducen mucho más que los murciélagos, pero viven menos tiempo, o por ejemplo las aves que vuelan se reproducen menos que las que no lo hacen, pero son más longevas. Estos son dos ejemplos muy intuitivos, pero es el patrón que encontraremos en la naturaleza, bien sea en el reino animal o vegetal. Esta situación ocasiona que en los seres vivos los recursos que vamos a dedicar a producir gametos son limitados, por lo tanto, si bien la reproducción es un hecho de alto interés para el organismo, también es cierto que necesita ser lo más eficiente posible para así disponer energía sobrante para mantenerse con vida en las mejores condiciones posibles.

La reproducción sexual en sus inicios se basaba en la fusión de dos gametos de igual tamaño -isogamia-, pero esta forma de reproducción pronto fue mejorada en la naturaleza apareciendo la anisogamia. En ésta, un gameto masculino y uno femenino, morfológicamente diferentes se unen para formar un cigoto, siendo esta situación la antítesis de la isogamia

Desde un punto de vista evolutivo, el comienzo de la vida y, por tanto, de la reproducción tuvo lugar en un medio marino. Los individuos liberaban sus gametos al medio líquido en el que vivían y tras la unión de éstos al azar se formaba un cigoto. La supervivencia de este cigoto dependía de su tamaño, que es lo que determina la reserva de nutrientes necesarios para pueda mantener su metabolismo hasta poder tomarlos del medio externo. El tamaño del cigoto, y a su vez su capacidad de supervivencia, va a depender del tamaño de los gametos que lo han formado.

En un principio los gametos de igual tamaño se fusionaban, originando un cigoto de un tamaño similar, pero pronto y como resultado de la presión selectiva para incrementar su tamaño y por tanto la capacidad de supervivencia, empezaron aparecer gametos de diferente tamaño, probablemente en principio producidos por el mismo individuo, para luego ser elaborados por sujetos distintos que habrían sufrido algún cambio para producir gametos de tamaños diferentes. Si suponemos que la cantidad de energía que van a dedicar los organismos a la

reproducción es aproximadamente constante, resultaba que si los progenitores generaban gametos más pequeños podían producir mayor número de gametos, aumentando la probabilidad de que estos se encuentren al azar con otro gameto y formar un cigoto, siendo la tasa de colisiones de gametos proporcional a su número. Pero esta estrategia implica un problema, y es que cuando se producían muchos gametos de pequeño tamaño, al fusionarse dos de estos microgametos ocasionaban cigotos muy pequeños con una limitación de nutrientes y con poca posibilidad de sobrevivir. Por el contrario, cuando los gametos que se producían eran de gran tamaño y estos se fusionaban, se formaba un cigoto de gran tamaño, con una gran reserva de nutrientes, y por tanto con una posibilidad alta de supervivencia. El problema que existía era que producir gametos de gran tamaño ocurre a expensas de generar un número relativamente bajo de estos, por lo que la posibilidad de que se encontrarán dos macro-gametos era pequeña, con lo que la posibilidad de supervivencia que tenían las sociedades celulares que solo producían gametos de gran tamaño era escasa.

El mayor éxito reproductivo se logró cuando en la misma población coexistían individuos que producían pocos gametos grandes pero con una gran carga de nutrientes junto con individuos que producían gametos de menor tamaño pero en un número muy elevado. De este modo muchos de los gametos pequeños tenían una alta probabilidad de encontrarse con un gameto de gran tamaño. Esta situación posibilitaba que la gran mayoría de los gametos de gran tamaño iban a poder fusionarse con algún gameto pequeño y, además, los cigotos producidos tenían un tamaño suficiente para disponer de nutrientes suficientes para sobrevivir y superar las primeras etapas del desarrollo embrionario. De esta forma, se establece la diferencia de sexos. De hecho, la diferenciación de tamaño de los gametos es lo que condujo a la aparición de la diferenciación de los sexos, surgiendo lo que reconocemos como reproducción sexual (Lessells *et al*, 2009)

La evolución originó un modelo en el que el sexo masculino se caracteriza por producir los gametos más pequeños y más abundantes en comparación a los que genera el sexo femenino. Aunque en la mayoría de las especies existe todo un conjunto de caracteres sexuales secundarios

diferenciadores de ambos sexos, la definición fundamental reside en la diferencia existente entre los gametos. El proceso que condujo a la anisogamia es aún más complejo y encierra explicaciones que muchas veces pueden ser asumidas, pero son difíciles de argumentar experimentalmente. Un rastro de ese enorme y complejo proceso se observa actualmente en la competencia espermática. En ese medio marino donde ocurre la reproducción de una especie existirían de varios individuos macho que producirían varios gametos que interferirían entre ellos, reduciendo su ventaja reproductiva. Para lograr una mayor probabilidad de éxito en la fecundación había que producir más gametos que el resto de los machos. Esta estrategia reproductiva origina una tendencia a que cada vez los espermatozoides presentaran un menor tamaño, cumpliendo el modelo de la limitación específica de gametos por individuo (Parker *et al.*, 1972; Parker, 1978).

A medida que aumenta la complejidad multicelular, los requisitos para la supervivencia de un cigoto son mucho mayores que los de la supervivencia del gameto y por lo tanto la isogamia resulta inestable en favor de la anisogamia. De todas formas y a pesar de la diferencia entre los gametos, la reproducción sexual sigue siendo un proceso muy simétrico en bastantes aspectos. En primer lugar, se produce un número similar de descendientes macho y hembra, por lo que puede aceptarse la existencia de una simetría en el rendimiento reproductivo, entendiendo este concepto como el número total descendientes de un sexo y otro. Esto es lógico, puesto que para originar un cigoto se necesita de la unión de un gameto masculino y uno femenino; el resto de los gametos sobrantes se perderán. Éste fenómeno se traduce en que cada descendiente tiene un padre y una madre. En segundo lugar, podríamos argumentar que existe una carga genética balanceada en la descendencia, donde la mitad de los genes provienen del padre y la otra mitad de la madre. Finalmente, también existe un equilibrio en la abundancia de los dos sexos y, de esta forma, el número medio de descendientes masculinos suele ser igual o muy cercano al número de crías hembra.

Una vez establecida la anisogamia y la existencia de dos sexos, se establece una forma de reproducción muy estable, a pesar de que las condiciones que promovieron la aparición de la anisogamia no son las mismas para que se

mantenga en el tiempo. De esta forma, aunque la fertilización interna tal vez surge como estrategia para minimizar las pérdidas en los costes energéticos de producción de células sexuales, puede causar una gran disminución en la competencia de los gametos como en la limitación funcional de los mismos. Aun así, incluso un nivel muy bajo de competencia entre gametos es suficiente para mantener la anisogamia una vez que el modelo se ha establecido evolutivamente. Es decir, las condiciones necesarias para el mantenimiento evolutivo de los dos sexos son mucho menos estrictas que las de su evolución inicial. Una vez que los gametos se han diferenciado y aunque los gametos masculinos superan en número a los femeninos, muchos de los producidos están destinados a permanecer sin fertilizar. Desde un punto de vista evolutivo, el hecho de incrementar la reserva de gametos masculinos contribuirá muy poco a la supervivencia del cigoto, ya que es el gameto femenino el que mayor relevancia va a tener en el momento de estabilizar el cigoto resultante de una fertilización exitosa. Desde este punto de vista, una vez generada la anisogamia no es fácil que ocurra un retorno evolutivo hacia la isogamia, ya que una vez establecidos los dos sexos la evolución por presión selectiva favorece rápidamente la relación 1:1 de sexos a través del principio de Fisher (1930): *bajo apareamiento aleatorio, el sexo que es más raro en la población, tiene una ventaja de aptitud que solo se pierde cuando se alcanza el equilibrio numérico con respecto al otro sexo.*

Los organismos multicelulares ancestrales pueden haber sido unos reproductores de difusión relativamente inmóvil, donde la selección sexual ha sido pre-zigótica y sobre todo por competencia del esperma. Hoy encontramos a los organismos celenterados (pólipos y medusas) y los equinodermos (estrellas de mar, erizos de mar) que realizan grandes gastos energéticos en producir sus gametos. En organismos más complejos, Darwin (1871) hizo hincapié en que la movilidad y la complejidad del comportamiento eran elementos vitales para la competencia sexual entre individuos de la misma especie y es entonces cuando aparecen los conceptos de selección pre-y post zigótica. Al aparecer la movilidad, los machos redujeron la competencia del esperma al poder acercarse a las hembras para liberar los gametos, lo cual acabó desarrollando la cópula y la propia fecundación interna, dando paso a un proceso de selección pre-zigótica. Esta forma de "selección sexual", concebida por Darwin como la presión evolutiva

sobre el desarrollo de los sexos, favorecería un conjunto de cambios en los fenotipos asociados al macho hasta alcanzar un comportamiento que les diera ventaja sobre otros individuos del mismo sexo en los apareamientos. La asimetría primigenia en los gametos que originó la anisogamia es la que generó la diferenciación de sexos y que ha ido progresando hasta lo que hoy son machos y hembras con todas diferencias que se asocian a ese resultado evolutivo.

Hoy en día, hemos alcanzado un punto evolutivo en el que un suceso de reproducción efectivo solo se puede concebir bajo el prisma de una compatibilidad máxima entre el sexo masculino y femenino. En el marco de la reproducción sexual actual, la tendencia más arraigada es que la hembra proporciona los recursos físicos para el desarrollo del cigoto tras ser fertilizado el ovocito por un espermatozoide. Este hecho tan simple, asegura la continuidad del acervo genético asociado a la especie y la vida.

Una vez que se ha explicado cómo pudo producirse la aparición de la reproducción sexual, habría que intentar justificar por qué ha sido tan exitosa. En la reproducción asexual existe un solo progenitor y éste origina uno o más individuos con idéntico acervo genético. Por lo tanto, no existen células sexuales o gametos, ni existen casi diferencias entre los progenitores y la descendencia. Aquellas diferencias que puedan ocurrir son debidas a mutaciones puntuales y se estabilizaran o no en las subsiguientes generaciones en sintonía con el proceso de selección. Por tanto, es un tipo de reproducción sin casi variabilidad genética y con una capacidad muy limitada de adaptarse a los cambios que pueden producirse en el entorno, pues depende sólo de las mutaciones puntuales que se van generando por azar. El éxito que tuvo la reproducción asexual se debió a su capacidad de colonización de hábitats por el gran número de descendientes que puede producirse en un corto periodo de tiempo, ya que una sola célula al dividirse produce dos descendientes.

Al contrario, en la reproducción sexual se requiere la participación de dos células con distinta carga genética para lograr un solo descendiente, siendo esta estrategia menos efectiva a la hora de lograr un gran número de individuos. En cambio, esta desventaja está claramente sopesada por la variabilidad genética



que se produce. En la reproducción sexual la información genética de los descendientes está conformada por el aporte genético de ambos progenitores mediante la fusión de los gametos, que son células haploides derivadas de un proceso complejo que conocemos como meiosis. Durante este proceso se consigue una reducción equilibrada del número de alelos que participa en la formación de un individuo adulto y de naturaleza diploide. Gracias a esta combinación de genes en los individuos diploides, la reproducción sexual genera descendientes genéticamente únicos, diferentes entre sí y diferentes a cada uno de sus progenitores, lo cual genera posibilidades adaptativas muy importantes para la progenie y por lo tanto para la especie, llegando incluso a originar especies diferentes que pueden estar más adaptadas, en un medio ambiente cambiante. Otras ventajas de este sistema reproductivo podrían ser:

i) Combinar variantes alélicas que se encontraban en diferentes individuos. Esta combinación puede ser valorada por presión selectiva y si es favorable, puede ser seleccionada en favor de un individuo con una mayor eficacia biológica, con la consiguiente difusión de caracteres ventajosos para las nuevas generaciones.

ii) Asociar mutaciones perjudiciales para generar individuos con una eficacia biológica muy baja. Estos individuos frente a la misma presión ambiental, podrían ser eliminados con facilidad de la población.

iii) Generar nuevas composiciones de genes, ya que cada gen puede provenir de un progenitor diferente. Estas nuevas combinaciones pueden ser más aptas que las que le precedieron en ese mismo ambiente cambiante.

Dentro de este escenario, el objetivo de los espermatozoides es siempre el mismo: fertilizar un óvulo y contribuir al genoma del cigoto resultante con la mitad de la carga genética asociada a lo que será un individuo adulto. Pero si cada óvulo solo requiere un espermatozoide para fecundar ¿por qué se producen en cantidades tan elevadas? El gameto masculino ha alcanzado grados de especialización tan singulares que se considera la célula animal más diferenciada a nivel morfo-funcional y estructural que existe en la naturaleza; especialmente si este se compara con el resto de células que conforman el soma de cualquier

especie con reproducción sexual. De hecho, si se presta atención al tamaño de los espermatozoides, se observa que este no guarda relación, con el tamaño medio celular de la especie que los produce. El espermatozoide del hombre tiene 60 micrómetros y es muy semejante al de una ballena; sin embargo, el de una rata casi triplica este tamaño. En el caso de *Drosophila bifurca*, esta especie genera uno de los espermatozoides más largos conocidos, alcanzado un tamaño de 58 mm (Pitnick *et al.* 1995; Pitnick and Markow, 1994). Lo que sí parece ser una regla general es que el número de gametos producidos por una especie depende del tamaño de los gametos. De hecho, las distintas especies de *Drosophila* producen pocos gametos, pero de gran tamaño. El modelo de la limitación específica de gametos establece que el número de gametos producidos por una especie es la razón entre los recursos disponibles para la producción de células sexuales y el tamaño de los gametos producidos.

## 1.2 LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA: ¿UNA SUBVERSIÓN DE LA REPRODUCCIÓN NATURAL?.

En los mamíferos evolucionados y concretamente en el hombre, una vez asumida la diferenciación morfológica de los gametos, encontramos que, en ciertas situaciones, no se resuelve el problema de determinadas parejas para contribuir de forma efectiva al mantenimiento de la carga genética de la especie. En ese momento, nos enfrentamos al concepto de esterilidad, condición que en raras ocasiones se resuelve de forma natural. Si bien la esterilidad ha estado siempre presente en el escenario de la reproducción sexual, esta nunca debió ser un problema para la evolución. Pero el concepto de esterilidad, entendido como un suceso biológico por el cual se interrumpe la lógica transmisión del acervo genético por parte de algunos individuos, tiene implicaciones muy particulares cuando la asociamos al ser humano. La esterilidad puede considerarse como una consecuencia de la complejidad del proceso de transmisión de la información genética. La esterilidad tiene una carga atribuible a la complejidad evolutiva que supone la fusión de gametos en anisogamia. De forma paralela al proceso evolutivo que genera la diversificación genotípica y fenotípica de los dos sexos, en el ser humano el desarrollo del comportamiento inteligente y el aumento del conocimiento de la biología del proceso reproductivo permite que podamos modular el destino final de la transmisión del acervo genético asociado a individuos que serían estériles bajo patrones ortodoxos de vida y hábitos de reproducción. Surge entonces un paso no previsto por la evolución y que se relaciona con el vasto espectro que cubre en estos momentos las **Técnicas de Reproducción Asistida -TRA-**.

Por reproducción asistida entendemos todas aquellas actuaciones médico-biológicas encaminadas a mejorar el proceso reproductivo en personas que tienen dificultades para dejar descendencia. Existen diversas técnicas de reproducción asistida, pero la más popularizada y conocida es aquella que consiste en la fecundación de un óvulo por un espermatozoide *in vitro* hasta conseguir un embrión. Este será posteriormente, transferido al útero de la mujer

con la intención de conseguir una gestación. Con este tipo de técnicas, se actúa en varios puntos de un proceso biológico complejo y exquisitamente diseñado por la evolución. De esta forma intervenimos sobre:

I) Los óvulos, para que sean de la mejor calidad posible y haciendo una estimulación ovárica para tener un número suficiente que nos permita lograr el embarazo

II) Los espermatozoides, para seleccionar aquellos que sean de una buena calidad. En esta última acción realizamos una actuación crítica, dado que vamos a seleccionar cuál va a ser el espermatozoide, o el grupo de espermatozoides, que se utilizarán para fertilizar el óvulo con unos criterios de subjetividad ineludibles en estos momentos. Por otra parte, intervenimos en el diseño de las diversas técnicas que vamos a utilizar para que el óvulo se fecunde de forma eficaz por ese espermatozoide.

III) Intervenimos en el período donde el embrión generado *in vitro* se va a desarrollar en sus primeras etapas para elegir y transferir en que creemos óptimo al útero.

IV) Finalmente, actuamos sobre las condiciones en las que un endometrio sea más receptivo y capaz de acoger el embrión que finalmente consumará el embarazo.

Las TRA permiten, por tanto, la selección y generación de embriones mediante fusión dirigida de gametos procedentes de individuos que se hubieran mostrado *poco rentables genéticamente* para la especie -*individuos estériles biológicos*- por la imposibilidad de transmitir su herencia genética a la descendencia. Si en este tipo de individuos, que aquí tipificamos como *estériles biológicos*, somos capaces de entender el problema asociado a la esterilidad, podremos generar descendencia viable, convirtiendo a esos pacientes en *fértiles asistidos*. Las TRA actualmente maneja tecnología de enorme complejidad que tratan de suplantar lo que la Biología le niega al paciente. Dentro de ese escenario y centrando el tema sobre el que pivota este trabajo de tesis doctoral, esta introducción se centrará en el factor masculino y sobre todo en aquellos aspectos encaminados a mejorar el rendimiento reproductivo que se presenta en

pacientes tipificados como *estériles biológicos* para conseguir individuos que se muestren como *fértiles asistidos*.

Desde una perspectiva más antropocéntrica y asociada a la evolución de un proceso biológico, podríamos asumir que las TRA representan un paso más en la evolución de los sistemas reproductivos canalizado por el uso de las habilidades intelectuales asociado a nuestra especie. De esta forma, se consiguen sortear y superar algunas barreras bio-físicas que hubieran impedido la reproducción de individuos que de forma natural serían estériles. Del mismo modo que la naturaleza seleccionó a las especies más competentes o con mayor capacidad de adaptación para sobrevivir, permitió también la aparición de la vida en comunidades organizadas y conscientes, en cuyo ambiente social podía cambiar las posibilidades de reproducción del individuo. La aparición de las TRA, supuso una operativa dentro de un modelo de selección pre-gamética, lo que conduce a dar un paso más allá en el concepto de la reproducción. En estos momentos, son los cambios que introduce nuestro mejor mecanismo de adaptación – basados en el conocimiento y en el razonamiento- lo que nos permite realizar modificaciones técnicas que interfieren en los mecanismos naturales de la reproducción. Estas modificaciones permiten un nuevo modo de lograr el objetivo biológico que tiene el individuo de perpetuarse mediante la reproducción.

# 1.3 SELECCIÓN ESPERMÁTICA EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA.

Los valores analíticos de las muestras de semen recogida en un eyaculado difieren de manera notable no solo entre distintos individuos, sino también entre distintos eyaculados de un mismo individuo. Para minimizar esa variabilidad se han estandarizado las condiciones de recogida en dos aspectos: i) los días de abstinencia considerando el tiempo transcurrido desde el último eyaculado a la muestra que se va a analizar, que de forma tradicional se ha fijado entre 3 y 5 días, y ii) la necesidad de tener dos muestras separadas en el tiempo, que concuerden en sus valores para poder establecer un diagnóstico con ciertos márgenes de fiabilidad.

Cuando en las clínicas de reproducción los profesionales se enfrentan con pacientes sin espermatozoides, con daños irreversibles en los mismos o bien con una calidad espermática muy baja, se tiene que recurrir a muestras seminales procedentes de donantes para alcanzar el éxito reproductivo deseado por la pareja. En estos casos hablamos de una paternidad diferente, es la paternidad por intención, que no la paternidad genética del nuevo individuo. A lo largo de este trabajo hablaremos de forma reiterada del semen de los donantes, ya que estos son personas fértiles, seleccionadas expresamente (entre otros parámetros) por su buena calidad seminal. Este tipo de individuos tiene mucho interés desde una perspectiva científica, dado que es muy difícil obtener información sobre aspectos reproductivos en una población fértil, puesto que este tipo de individuos, normalmente, no acude al médico por una consulta relacionada con esterilidad asociada al factor masculino.

La selección de donantes de muestras seminales se realiza bajo unos criterios multifactoriales para eliminar en lo posible cualquier tipo de riesgo, tal y como se explicitaba en la primera legislación al respecto, en la Ley Española de Reproducción Asistida, Ley de 22 de noviembre de 1988 (35/1988) y en la posterior, actualmente vigente, la Ley de 26 de mayo de 2006 (14/2006), sobre

técnicas de reproducción humana asistida. («BOE» núm. 282, de 24 de noviembre de 1988, páginas 33373 a 33378 y «BOE» núm. 126, de 27/05/2006). La preservación de gametos se encuentra también legislada bajo la ley de tejidos de 4 de julio de 2014 (9/2014) por la que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos. Sin embargo, los requerimientos de preparación del esperma para mejorar su calidad relativa normalmente son de una gran importancia para el éxito de la técnica reproductiva, incluso en los casos en los que se parte de un semen de buena calidad, se maximizándose este efecto en el caso de los pacientes. En la selección de donantes la ley contempla tanto aquellos aspectos que atañen a calidad de la muestra seminal que se utilizará para producir las dosis seminales, como a los de carácter genético, de ausencia de enfermedades de transmisión sexual, así como obtenidos de una exploración física general que descarte posibles malformaciones transmisibles. Los criterios para la selección son muchísimo más estrictos que los que se requieren a los pacientes. En el caso de los donantes, no se les demanda sólo que puedan reproducirse, sino que sean unos buenos reproductores. De esta forma, el donante pasa por unos rigurosos controles que incluye:

- i) Anamnesis: desarrollo de la historia clínica donde se descarta que haya enfermedades familiares que puedan ser transmitidas a la descendencia.
  
- ii) Selección de características físicas: realización de una revisión general, con mayor atención en el aparato genital, para descartar que exista una patología transmisible.
  
- iii) Realizar una exploración de factores genéticos de riesgo: Debido a que la ley exige estudios genéticos acordes al conocimiento científico actual, prácticamente en la mayor parte de los centros de reproducción a los donantes se les realiza un cariotipo para descartar que tengan alguna anomalía por reordenamiento cromosómico. Actualmente los donantes son analizados genéticamente para lograr la mayor compatibilidad con la mujer que recibirá el espermatozoide o el

cigoto de él derivado y son excluidos si son portadores de alguna enfermedad recesiva importante como es la fibrosis quística, la atrofia muscular espinal, etc.

iv) Estudio de parámetros de salud general: con independencia de tener una edad adecuada, el donante tiene que presentar un buen estado de salud en el momento de la donación y la determinación del grupo sanguíneo para compatibilizarlo con el de persona que será inseminada.

v) Estudio de factores infecciosos: se incluyen test demostrativos de ausencia de cualquier enfermedad de transmisión sexual -Hepatitis B, Hepatitis C, Sífilis, VIH, *Chlamidia*, *Mycoplasma*, *Citomegalovirus* y Gonorrea-. También actualmente, en algunos casos, se analiza la infección el virus del papiloma humano, el HTLV I y II y el virus Zika, especialmente si el sujeto en cuestión procede o ha visitado recientemente regiones con presencia de Zika o HTLV. Para ello se realizan unos análisis de sangre antes de recoger la muestra y a los seis meses de tenerla congelada, para completar el periodo de cuarentena de las infecciones. Actualmente esto puede sustituirse por un análisis por PCR para detectar esas posibles enfermedades de transmisión sexual, especialmente en el caso de Hepatitis B, C y Sida en la que se detectan el ADN en sangre del donante.

vi) Factores psicológicos: supone una entrevista con el psicólogo y la realización de un test psicológico para descartar patologías y además asegurar la voluntariedad consciente de la donación.

vii) Calidad reproductiva: en estos casos se es más exigente con los criterios del seminograma que en el caso de los pacientes. En primer lugar, se valora el número de espermatozoides ( $\geq 50$  millones por mililitro, frente a los 15 millones que damos como válidos para los pacientes), movilidad ( $\geq 50\%$  con movilidad progresiva, frente a un  $32\%$  que consideramos suficiente en los pacientes) y morfología ( $\geq 8\%$  de formas normales, en comparación con el  $4\%$  con el que pasamos el criterio de normalidad en los pacientes), y que son los criterios de normalidad son los del último manual de la OMS (2010). Posteriormente nos aseguramos que la muestra supera el proceso de congelación y descongelación, quedando en unas condiciones favorables para su uso posterior. Esto nos



garantiza una calidad determinada post-congelación, mientras que las muestras en fresco en ocasiones tienen oscilaciones grandes y puede ser que en el momento de uso no se encuentre en las condiciones adecuadas. Dentro de las pruebas de los donantes, prácticamente todos los centros incluyen también los test de fragmentación espermática, y posiblemente en poco tiempo se incluyen pruebas como dinámica de fragmentación, nivel de actividad de las DNAsas, capacidad de antioxidante, longitud de los telómeros, así como otras pruebas que nos garanticen que el semen que vamos a utilizar tendrá una excelente calidad reproductora.

El coste de todos los análisis mencionados es relativamente elevado, pero genera, en cierta medida, un marco de seguridad para su uso en mujeres que van a ser sometidas a técnicas como la inseminación artificial o de fecundación in vitro utilizando muestras procedentes de banco de semen.

Normalmente en los centros de reproducción asistida no suele ser frecuente que un paciente muestre un eyaculado que se asemeje al de un donante. Lo que es frecuente encontrar en la clínica es un semen alterado, en mayor o menor grado, dependiendo de si hay asociado un factor masculino importante. Hemos de tener en cuenta que cuando sólo existe una pequeña alteración de la fertilidad del varón y la mujer tiene una buena fertilidad, la reproducción se suele producir de manera natural y esas parejas no asisten a las clínicas de reproducción. En el caso de que la pareja tenga una esterilidad donde el factor masculino es determinante de la infertilidad, adicionalmente a este tipo de análisis hay que añadir la complejidad de minimizar el número de espermatozoides con defectos y así obtener una muestra final que, aunque presenten un menor número de espermatozoides, estos tendrán una calidad relativa mayor. Esto nos permitirá una mayor probabilidad de elegir un gameto libre de defectos para fertilizar el ovulo de la pareja.

Las causas que ocasionan un daño espermático son muy variadas e incluye todos los procesos comprendidos desde la génesis de los testículos, la espermatogénesis (generación de células haploides) y la espermiogénesis (generación de un espermatozoide de morfología estándar), así como todos los

procesos que se relacionados con la fisiología del proceso de eyaculado y que se relacionan con las glándulas cuyas secreciones contribuyen al eyaculado final. De esta forma, podemos clasificar las posibles causas:

- **Genéticas**

- Cromosómica aneuploidias: 46XXY; 46XYY; Trisomía del 21
- Cromosómica macroscópica no aneuploidias: reorganizaciones parciales del genoma (translocaciones recíprocas y robertsonianas, inversiones, inserciones o deleciones).
- Genética: la pérdida de tan solo una parte del cromosoma tales como las asociadas al gen *SRY* (Wallis MC *et al.*, 2008), o alteraciones relacionadas con la región regiones *AZF*, (Reijo, 1995) se asocian a cuadros de infertilidad severos. Por otra parte, existen mutaciones en que afectan a alguno de los genes implicados directamente en la fertilidad (Fibrosis quística), mutaciones del gen *SYCP3* como receptor androgénico (Yuan 2000), o bien alteraciones en los genes *DNAI1* Y *DNAI2* relacionados con la crisis inicial ciliar primaria, (Zariwala, 2006).
- Epigenética: Alteraciones del empaquetamiento de las protaminas DNA, cambios en el perfil de metilación de regiones promotoras, etc...

- **Hormonales:**

- Hipogonadismo hipogonadotropo.
- Hipogonadismo hipergonadotropo.
- Alteraciones en los niveles de testosterona o en los receptores de la testosterona a nivel celular.
- Alteraciones en los niveles de estrógenos.
- Moduladores de la acción de los estrógenos
- Alteraciones en los niveles de la Proteína transportadora de hormonas sexuales, SHBG

- **Anatómicas:** el varicocele, la orquitis, los traumatismos testiculares, la torsión testicular.

- **Tóxicos y químicos:** el efecto de las gonadotoxinas, que cada vez tiene un papel más importante (Duty *et al.*, 2003; Meeker *et al.*, 2011).

- **Causas generales.** Enfermedades generales: enfermedades sistémicas, patologías que en ocasiones afectan a varios órganos, o incluso a todo el organismo. Algunas tienen un origen congénito como son la anemia falciforme, el síndrome de Prader Willy, o el síndrome de Kartagener, etc. Otras, por el contrario, son adquiridas como la diabetes, el hipertiroidismo, o la insuficiencia renal o hepática. Pueden causar esterilidad por factor masculino sea de forma directa o indirecta como consecuencia de su tratamiento médico o quirúrgico.
- **Infeciosas:** las infecciones, unas veces de testículo o del epidídimo y a otras glándulas accesorias que participan en la formación del plasma seminal.
- **Esterilidad de tipo inmunológico,** que va adquiriendo cada vez mayor importancia dentro de las causas de esterilidad asociadas al varón.
- **Edad:** La edad del varón afecta en menor grado a la capacidad reproductora de la pareja, aunque se demuestra una disminución significativa a partir de los 40 años.

## 1.3.1 VALORACIÓN DEL VARÓN.

El análisis del semen es la única herramienta que está ampliamente aceptada como método para determinar la capacidad fértil del varón. Por ello y por ser relativamente fácil de realizar debe considerarse como uno de los puntos de partida en los estudios de infertilidad en la pareja al tratarse de un instrumento capaz de detectar algún problema en la salud reproductiva masculina. Así mismo, los resultados de un seminograma también orientan sobre qué tipo de tratamiento de reproducción asistida se debe aplicar cuando se aborda un caso de infertilidad. Pero el valor fundamental del seminograma hoy en día es para indicar a nivel médico si hace o no hace falta una técnica de reproducción asistida por indicación masculina.

El seminograma analiza unos parámetros muy básicos, basándose en unos datos estadísticos de la población fértil. La Organización Mundial de la Salud elabora un manual (con ediciones actualizadas cada cierto tiempo) cuyo objetivo es estandarizar los procesos de evaluación de muestras seminales para que sean comparables y reproducibles, estableciendo unos valores de referencia mínimos por debajo de los cuales se considera que la calidad del semen es deficiente.

Aunque no es una prueba difícil de realizar, debe ajustarse a unas normas desde la obtención hasta su procesado para que su información sea siempre interpretable y comparable. Por ello se considera fundamental que sea procesado por un laboratorio especializado, y si es posible que se dedique a reproducción. La muestra debe obtenerse por masturbación con las mayores medidas de higiene posibles y se debe entregar en un recipiente estéril. Cuando se recibe la muestra en el laboratorio de Andrología en primer lugar hay que rotular y etiquetar el bote de forma correcta para poder mantener una trazabilidad de la muestra que es uno de los elementos básicos de la seguridad. A continuación, se debe comprobar en la ficha del paciente cuales son las pruebas a las que se va a someter la muestra.

Entre las distintas pruebas a las que una muestra de semen es factible de ser sometida estarían las básicas de recuento (número), velocidad y morfología.

El seminograma se centra básicamente en el recuento de espermatozoides, un análisis de su movilidad y morfología, así como un análisis macroscópico (volumen, color, pH, y cinética de licuefacción). En un segundo apartado se centra en pruebas complementarias que informan sobre el estado fisiológico de los espermatozoides, así como una estimación del número de espermatozoides con potencial fecundante gracias a la capacitación. La capacitación consiste en intentar reproducir in vitro el comportamiento en su hábitat natural, el aparato genital femenino. Para cuantificar este potencial se contabilizan los espermatozoides móviles que se recuperan tras su procesamiento, obteniendo así el llamado Recuento de Espermatozoides Móviles (REM). Dependiendo del recuento y de la movilidad de la muestra en fresco, así como el destino de la muestra (Inseminación Artificial, ICSI, etc) la capacitación se podrá realizar mediante dos métodos principalmente, la Migración o “*swim-up*” y la Centrifugación en gradientes de densidad.

Aunque hay hombres que tienen hijos a pesar de tener algún parámetro seminal alterado, y que varones que teniendo un seminograma normal pueden presentar una esterilidad, la información que se obtiene tras un seminograma resulta tan importante que en todas las guías y protocolos médicos está indicada la realización de un seminograma como prueba de rutina al varón cuando la pareja acude al médico por problema de fertilidad.

Otro de los elementos a considerar dentro del estudio del varón, en concreto, de la parte seminal es la evaluación del daño del material genético espermático. Se puede evaluar a nivel de la segregación correcta de los cromosomas en los espermatozoides mediante las técnicas de FISH o bien mediante el estudio de la fragmentación del ADN espermático. Este último punto es un elemento controvertido pero que ha generado multitud de estudios y trabajos al respecto.

La fertilización, división y desarrollo del embrión dependen en parte de la integridad del ADN espermático. Existen evidencias que muestran que el daño en el ADN afecta negativamente a los resultados reproductivos y que los espermatozoides de hombres infértiles poseen substancialmente más daño que el de los hombres fértiles. Hay diferentes pruebas para estimar la fragmentación del ADN espermático, tanto cualitativa como cuantitativamente. En muchos laboratorios se realiza el test de Test de fragmentación que mide la dispersión de la cromatina y que coloquialmente se conoce por su primer nombre comercial "*Halosperm*" que determina el estado de fragmentación nuclear según el nivel de dispersión de la cromatina espermática, a partir de una descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto. Aquellos espermatozoides que tiene un ADN íntegro el halo de dispersión es mayor y más homogéneo que aquellos que si presentan daños estructurales en su material genético.

Los valores que fragmentación del ADN que resultan pueden clasificarse en tres rangos de acuerdo a los estudios clásicos de Evers:

- "Excelente potencial de fertilidad", aquellos en los que el porcentaje de fragmentación (DNA Fragmentation Index –DFI-) es < 15%.
- "Buen potencial de fertilidad" aquellos en los que el DFI está entre 15 - 29%.
- "Pobre potencial de fertilidad" aquellos en los que el DFI  $\geq$  30 %.

Este último grupo suele tardar 7 veces más tiempo en alcanzar el embarazo siendo la tasa de aborto del 39% y el 1% mensual de posibilidades de conseguir el embarazo por medios naturales.

La confluencia en un varón de una o varias de estas causas, generalmente llevan a alteraciones en el seminograma. En función de las alteraciones del seminograma existe una nomenclatura para la descripción de las mismas:

- Azoospermia (no hay espermatozoides en el eyaculado),
- Hipospermia (poco volumen de eyaculado),

- Oligozoospermia (poca concentración espermática en el eyaculado),
- Teratozoospermia (espermatozoides con una mala morfología en el eyaculado),
- Astenozoospermia (espermatozoides lentos en el eyaculado),
- Necrozoospermia (espermatozoides muertos en un porcentaje muy elevado en el eyaculado), o bien combinaciones de estas situaciones concurriendo en un mismo paciente.

Cuando nos encontramos con estas alteraciones en el laboratorio, para poder trabajar en las mejores condiciones y conseguir revertir el factor masculino se intenta realizar una selección espermática encaminada a conseguir que la muestra con la que se va a trabajar tenga la mayor cantidad posible de espermatozoides de características normales. De aquí la importancia de las técnicas de selección espermática, ya que con ellas tratamos de mejorar la posibilidad reproductiva que tienen algunas parejas para transformar varones que se comportan como *estériles biológicos* en varones que podríamos tipificar como *fértiles asistidos*.

## 1.3.2 ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA DIRECTAS.

Entre las metodologías más utilizadas en las TRA para realizar una selección espermática efectiva podemos resaltar las siguientes:

### ***i) Swim up***

Esta técnica fue desarrollada por Parrish y col (1984) y se basa en la selección espermática de los espermatozoides de mejor motilidad. La idea es muy sencilla: lo primero es esperar un tiempo hasta que el eyaculado pasa al estado líquido, el eyaculado licuado se centrifuga (10 min a 400g) y en el fondo del tubo se forma un *pellet* en el que se encuentran los espermatozoides. Se elimina el sobrenadante y se añade de 0,3 a 0,5 ml de medio de cultivo sobre el *pellet* dejándolo que resbale por las paredes del tubo, para evitar la formación de

burbujas y turbulencias. Se incubaba a 37°C durante 45 min, tiempo en el que se produce un ascenso de los espermatozoides con mejor movilidad que pasan a la parte superior del medio desde donde serán rescatados.

El ascenso de los espermatozoides está directamente relacionado con la temperatura y el tiempo de incubación, por lo que éste no debe de ser excesivamente largo para rescatar de ese modo sólo los de mejor movilidad. Esta técnica tiene la ventaja de que es muy sencilla ejecución y está al alcance de cualquier centro de reproducción, ya que sus costes son muy bajos. Además, la muestra que se obtiene es muy limpia (más del 90% de espermatozoides con calidad A+B). Tiene el inconveniente de que rescata un bajo número de espermatozoides, por lo que esta estrategia está indicada para muestras de semen de elevada concentración y movilidad (muy útil en sujetos normozoospermicos). Hay una variante esta técnica en donde los tubos se colocan en un ángulo de 30°, de manera que al extender la superficie del medio y disminuir la altura de la columna del medio que tienen que atravesar se conseguían rescatar entre un 50 y un 100% más de espermatozoides (Palma, 2001).

## ii) **Capacitación espermática en gradientes de densidad**

La capacitación espermática mediante centrifugación en gradiente de densidad es una técnica que se basa en el principio de sedimentación y retención diferencial de células al atravesar medio de densidad variable. Las células, con superficies equivalentes, sedimentan en las zonas que tienen densidades similares. De esta forma los gradientes actúan como un filtro para los espermatozoides sin movilidad progresiva, o que presentan una cabeza con niveles de condensación de la cromatina bajos o bien leucocitos o células epiteliales que pudieran estar presentes en el eyaculado. Los espermatozoides con mejor nivel de compactación de la cromatina en su cabeza, se depositan en el fondo del coloide y se seleccionan positivamente. El coloide que normalmente se usa son partículas de sílice rodeadas de polivinilpirrolidona (PVP). Se suelen utilizar dos o tres capas de diferente densidad para generar gradiente (40-80% y 20, 40, 80% respectivamente). La técnica muy sencilla, consistiendo en colocar las capas del



gradiente en un tubo de centrifuga, quedando la de mayor densidad en el fondo y la de menor en la parte superior; colocando sobre ella la muestra de semen que normalmente se ha sometido a un lavado simple previo y a continuación se centrifuga durante unos 20 minutos a 300 g. Terminado el proceso se genera un pellet en la parte inferior donde se concentran los espermatozoides con mejor movilidad, siendo esta fracción la que se va a utilizar. El pellet que finalmente se obtiene se re-suspende de nuevo en medio y los espermatozoides estarían disponibles para su utilización en TRA.

Como la mayor parte de las técnicas, el uso de gradientes tiene sus ventajas y sus inconvenientes. Como ventaja destacar que se recuperan muchos espermatozoides y además en un medio libre de plasma seminal u otros tipos celulares; es por ello que está indicado en muestras con pocos espermatozoides, poca movilidad o que tienen mucha suciedad derivados de restos celulares y otro tipo de detritos. Como inconveniente resaltar es que es una técnica bastante dependiente del operador ya que requiere mucha precisión durante todo el procesado de la muestra (López-Fernández *et al*, 2013). Además, el PVP tiene un posible riesgo de endotoxina y se ha descrito que concentraciones superiores al 2% pueden tener efectos tóxicos sobre la producción de blastocistos (Dozortsev *et al*. 1995; Jean *et al.*, 2001).

### **iii) Técnicas de selección mediante cámaras microfluidicas**

Se han diseñado recientemente dispositivos de tipo microfluídico con la intención de evitar los daños asociados a la centrifugación de los espermatozoides, existiendo evidencias de que los espermatozoides recuperados mediante este sistema mantienen la integridad de su DNA en un porcentaje superior a la muestra original, sobre todo reduciendo el número de espermatozoides con roturas de la cadena doble del DNA, daño que se ha relacionado con los fallos de implantación y los abortos de repetición. La tecnología microfluídica ha sido ampliamente estudiada para diversas aplicaciones en análisis biológicos y químicos. Las cámaras microfluídicas son dispositivos utilizan pequeños volúmenes de líquido, lo que permite separar las células por motilidad dentro de pequeños volúmenes, y se crean para imitar lo que sucede naturalmente en el

tracto genital femenino. La metodología de clasificación de espermatozoides basado en procedimientos microfluídicos es una opción valiosa para la eliminación de los pasos dañinos de centrifugación. Este tipo de dispositivo suele constar de una entrada para la inyección de una muestra de semen en bruto no procesada y una o dos cámaras de plástico separadas por membrana porosa. Los espermatozoides más sanos y móviles se mueven a través de la membrana porosa dejando atrás espermatozoides menos funcionales y muertos en la cámara inferior. Utilizando esta tecnología de clasificación, un técnico sólo tiene que inyectar la muestra de semen en el dispositivo y luego puede recoger el espermatozoide sano de la cámara superior en unos 30 minutos, por lo que es muy fácil de usar. Estudios previos de dispositivos microfluídicos han demostrado que la motilidad de la muestra de espermatozoides se incrementa casi en un 100% y el análisis de la morfología de los espermatozoides recuperados también mejora después de la clasificación microfluídica.

#### **iv) Inyección intra-citoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI)**

Realmente el IMSI es una técnica de selección espermática directa que no prepara una muestra con las mejores condiciones para una inseminación, sino que permite seleccionar directamente el mejor espermatozoide disponible desde el punto de vista morfológico para fecundar el ovocito. Por lo tanto es una técnica que se debe acoplar al ICSI. La IMSI se fundamenta en la visualización de los espermatozoides a un gran aumento gracias al uso de un microscopio que dispone de una óptica especial para generar aumentos del objeto diana 6000 veces superior a su tamaño original. Esta capacidad, frente a los 400 aumentos que proporcionan los microscopios convencionales utilizados para ICSI, permite una notable mejoría en el momento del análisis morfológico detallado del espermatozoide (*de Vos 2003*). Para realizar esta técnica, existen diferentes variantes de manejo del espermatozoide previas a la selección por IMSI. Previamente a la selección del espermatozoide mediante la microscopía de alta magnificación hay que usar alguna de las técnicas anteriormente descritas para preparar el semen. Normalmente el semen se suele preparar mediante un *swim up* realizado a temperatura ambiente antes de iniciar la selección al microscopio.

Para que los espermatozoides se muevan más lentos y podamos tener una visión mejor de los mismos se utiliza el PVP. El PVP en un medio fisiológico ayuda a que los espermatozoides ralenticen su movimiento y podamos conseguir una mejor captura de aquellos que observamos con mejor morfología. El espermatozoide que se selecciona se retira con una aguja de micro-inyección y se deposita en otra gota de PVP limpia en la misma placa de Petri donde se acumulan los espermatozoides seleccionados.

Gracias a la alta magnificación pueden visualizarse las vacuolas en el interior de la cabeza del espermatozoide, la mala disposición de la cola respecto a la cabeza, defectos en la pieza intermedia, y otros cambios de morfología imposibles de detectar en microscopía de ICSI convencional. Hoy conocemos que muchos de los espermatozoides que tienen anomalías cromosómicas presentan morfologías alteradas, y que parte de las alteraciones que observamos en la cabeza del espermatozoide no se reflejan de forma directa en un incremento en el daño en el ADN de los cromosomas (Berkovitz A, et al, 2006; Gosálvez et al, 2013), pero no sabemos si puede interferir en otros aspectos fisiológicos que puedan dificultar la singamia tras realizar ICSI. La ventaja de este procedimiento se fundamenta en lo extremadamente precisa que resulta la selección morfológica del espermatozoide. Esta posibilidad minimiza daños asociados a malformaciones no visibles a 400 aumentos. La consecuencia es el aumento de la tasa de fecundación y sobretodo el descenso de la tasa de aborto espontáneo. (Balaban et al, 2011). Es una técnica muy segura ya que no realiza ningún tipo de manipulación crítica sobre los espermatozoides que pueda repercutir negativamente en la posterior micro-inyección dentro del ovocito, evitándose de esta forma cualquier tipo de reacción adversa sobre los embriones o el feto (Cassuto *et al.*, 2009, 2014). El inconveniente del IMSI, es el alto coste que tiene el equipo de microscopia y que es muy dependiente del operador que está seleccionando los espermatozoides. Se precisa de un periodo largo de entrenamiento para poder realizarlo con eficacia y rapidez. De hecho, y aunque este aspecto no se ha analizado con detalle si durante la selección se invierte mucho tiempo se genera un daño iatrogénico sobre el espermatozoide podría ser muy negativo.

#### **v) Inyección intracitoplásmica espermática fisiológica (*Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection* PICS)**

La técnica conocida como PICS se basa en seleccionar los espermatozoides tras aproximarlos a una solución que contiene ácido hialurónico. Esta sustancia presenta unas características similares a la presente en la corona del ovocito. De esta forma, los espermatozoides maduros deberían adherirse sobre ese medio de tal forma que éste quedaría inmóvil pero motil. Este tipo de espermatozoides es que se selecciona para una micro-inyección espermática clásica. Esta es una técnica novedosa pero aún está pendiente de afianzarse dentro del mundo de la reproducción asistida. Las indicaciones principales serían seleccionar espermatozoides cuando existe un nivel alto de fragmentación del DNA espermático (Parmegiani *et al*, 2010).

#### **v) *Magnetic Activated Cell Sorting* -MACS-**

La base de esta técnica está descrita desde hace casi dos décadas (Glander y Schaller, 1999). y se utiliza de manera rutinaria en el campo de la inmunología y hematología clínica. La técnica de MACS en el campo de la reproducción se basa en las modificaciones superficiales que presentan células apoptóticas, la cuales externalizan un fosfolípido que suelen encontrarse en la hemi-membrana interna de la bicapa lipídica. Cuando las células espermáticas tienen daños intracelulares (como alteraciones la integridad de su material genético) entran en la ruta de muerte celular programada o apoptosis, activando la ruta de las caspasas en la cual de forma colateral se altera el funcionamiento de las flipasas, que son las enzimas encargadas de mantener la correcta disposición de los fosfolípidos de membrana hacia el interior o hacia el exterior celular. De este modo queda expuesta hacia el exterior celular la fosfatidilserina. La proteína Anexina V muestra una alta afinidad por la fosfatidilserina, empleándose como forma de marcaje a aquellas células que han entrado en apoptosis. En la técnica de las MACS se emplea una versión modificada de estas proteínas puesto que la Anexina V empleada presentan unidas unas micro-esferas metálicas. De esta forma, cuando los espermatozoides se someten a un campo magnético, aquellos que tienen externalizada la fosfatidilserina y por tanto

están en una vía apoptótica quedarán retenidos a su paso por la columna magnética, siendo descartados para ICSI (Glander y Schaller, 1999). La muestra que se eluye a través de la columna contiene, teóricamente, espermatozoides que no han externalizado la fosfatidilserina y por lo tanto tienen menos posibilidades de presentar daño en el ADN.

Los mejores resultados se obtienen al combinar esta técnica con la IMSI (MACS+IMSI). De este modo, al observar a los espermatozoides que han sido eluidos por la columna de las MACS nos permite una pre-selección de espermatozoides en base a la ausencia de marcadores morfológicos solos apreciables con alta magnificación que están relacionados con la fragmentación ADN. La muestra espermática será así sometida a un filtrado molecular, descartando en primer lugar por las columnas MACS aquellos que presentan fosfatidilserina en su superficie y sobre la muestra eluída se realizará con IMSI para una realizar una segunda selección basada en parámetros morfológicos de los espermatozoides visibles por alta magnificación.

### **1.3.3** ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA INDIRECTAS.

Estas son técnicas que se basan en mejorar la muestra de semen de forma indirecta sin tener que trabajar directamente sobre la muestra, por el contrario, se centran en aspectos fisiológicos que van a mejorar las características del eyaculado o van a aprovechar la forma fisiológica de la eyaculación para conseguir seleccionar las partes del mismo con mejor motilidad, concentración o con menos daño en el ADN.

El aumento del conocimiento sobre el proceso de la reproducción natural no sólo permitirá entender como ocurren los fenómenos que comprenden la fecundación en el escenario biológico, si no que supondrá una importante ayuda para mejorar las técnicas de reproducción asistida en la práctica clínica de este campo de la Biomedicina. Además de las técnicas de selección directas, se encuentran aquellas que seleccionan a los espermatozoides utilizando

metodologías no invasivas, intentado interactuar sobre el momento inmediatamente anterior a la eyaculación. De forma más concreta, se estudió como la ausencia de periodos de abstinencia previos a la eyaculación y el fraccionamiento del eyaculado podría repercutir en un beneficio en la calidad de la muestra seminal, y ver cómo puede repercutir en la utilización posterior para aplicar técnicas clásicas de selección espermática. Estos dos puntos suponen dos estándares clásicos en el manejo de las muestras seminales de los varones:

I) periodos de abstinencia de 3-4 días previos a la recogida de la muestra que se utilizará para fecundar el ovocito y II) utilización del eyaculado total en el procesamiento.

Hay que tener en cuenta que los ambientes a los que se somete un espermatozoide cuando éste es eyaculado y a lo largo de su procesamiento en el laboratorio son totalmente diferentes de los que ese mismo espermatozoide tendría en la reproducción natural. Por lo tanto, parece lógico que intentar simular las condiciones naturales puede suponer una ventaja a la hora de manejar a los espermatozoides de una manera más acorde con su comportamiento biológico. De esta forma se generará un menor daño en el espermatozoide, se realizará una mejor selección de espermatozoides y se incrementará la capacidad de fertilizar el óvulo con éxito. La reproducción es un proceso biológico y como tal admite una serie de cambios para poder ejecutarse con normalidad. De hecho, en las TRA no parece necesario que todos los procesos y funcionalidades que operan en condiciones naturales se cumplan de manera ortodoxa para lograr un éxito reproductivo, sino que simplemente se necesitan cumplir unos mínimos para que el proceso de la reproducción ocurra de manera satisfactoria.

Si tuviéramos que simplificar el proceso reproductivo diríamos que son tres los elementos principales los que están implicados en el proceso I) el óvulo, II) el espermatozoide y III) endometrio. La unión del óvulo y el espermatozoide forma el cigoto que continua en un proceso de división celular mitótica en el interior de la zona pelúcida hasta el estadio de blastocito, una vez llegado a este estado el embrión sale de la misma y es cuando empieza la interacción con la madre, siendo el primer punto de encuentro el endometrio. Por lo tanto, la

combinación de estos tres elementos tiene que tener la suficiente calidad mínima para conseguir la gestación.

En muchas ocasiones la diferencia entre lograr o no lograr la gestación va a depender en gran parte del espermatozoide. De ahí la importancia que tienen los procedimientos empleados para obtener una muestra inicial de semen de calidad y con la que actuar posteriormente para seleccionar el mejor espermatozoide posible.

Es importante tener en cuenta dos conceptos que concurren en un eyaculado: la parte -el espermatozoide- y el todo - el eyaculado-. Si bien es cierto que un solo espermatozoide es el que fertilizará el óvulo, también es cierto que, de modo natural, un solo espermatozoide no puede acometer la tarea de la fertilización si no ha sido eyaculado en un entorno como es el semen. Lo que conocemos como semen es el conjunto de una serie de secreciones que produce la próstata -compuesta a su vez de un gran número de glándulas, con diferentes funciones y características- y las vesículas seminales. Estas secreciones que se mezclan con las que se producen en el testículo y el epidídimo. Además, hemos de conocer que la salida de los espermatozoides no se produce de modo aleatorio, sino que sigue una secuencia concreta y que viene determinada por los diferentes tiempos de los que se compone la eyaculación como parte culmen de las relaciones sexuales. Conocer la eyaculación nos ayudará a entender cómo se produce la salida de los espermatozoides, y porque existen diferencia entre las distintas partes del eyaculado (Semergen 2014).

Aunque la eyaculación se encuentra generalmente unida al orgasmo, nos encontramos ante dos procesos fisiológicamente diferentes (Levin,2011), una de emisión y otra de expulsión e intervienen varios órganos como son el epidídimo distal, el conducto deferente, la vesícula seminal, la próstata, la uretra prostática y el cuello vesical (Giuliano y Clément 2005). Lo primero que ocurre, en la fase de emisión, es el cierre del cuello vesical de manera que el líquido seminal no pueda viajar de forma retrógrada hacia la vejiga. Este permanece cerrado hasta el final de la fase de expulsión. (Revenig, 2014). A continuación, se produce la formación del “coctel” seminal, formado por las secreciones de la próstata, del

epidídimo distal y los conductos deferentes (que aportan los espermatozoides) y los fluidos de las vesículas seminales. Primero se contrae la porción superior de la próstata, mientras que la porción distal de la uretra prostática, se dilata. Esta situación genera una acumulación de su propia secreción y del contenido de las ámpulas deferentes, donde se han acumulado los espermatozoides con las contracciones del epidídimo distal y de los conductos deferentes. En la porción distal la uretra se encuentra cerrada por el esfínter de la uretra, por lo que se provoca una gran presión en la zona. (Christophe *et al.*, 2002). A continuación, se contraen las vesículas seminales (que van a producir el 70 % del plasma seminal) y se relaja el esfínter de la uretra de modo que ese coctel que se encontraba bajo presión se desplaza desde la uretra prostática inferior, hacia los segmentos bulbar y peneano de la uretra, por lo que serán los primeros en ser expulsados. La fase de emisión viene a durar de 5 a 20 segundos y se acompaña de una sensación de inminencia e inevitabilidad de la eyaculación. La expulsión continúa sin interrupción con la etapa anterior, consistente en la propulsión del semen de modo pulsátil a lo largo de la uretra hacia el exterior. Esto ocurre debido a la acción de bombeo ejercida por la contracción intermitente y sincrónica de los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso, que rodean al pene, asociada a la de otros músculos del suelo pélvico, incluidos los esfínteres externos urinario y anal. El primer impulso seminal se libera con una velocidad superior a 50 km/h y puede tener energía para alcanzar más de 2 m. de manera que sea capaz de introducir el semen en lo más profundo de la vagina; los siguientes impulsos son de menor energía. Debemos de recordar que este primer impulso contiene el mayor concentrado de espermatozoides y las secreciones de la próstata (ricas en PSA, fosfatasa ácida, ácido cítrico y zinc), mientras que las fracciones finales se encuentran los fluidos secretados por las vesículas (fructosa y prostaglandinas). La fase de expulsión dura de 8 a 15 segundos y se acompaña, normalmente, de la intensa y placentera experiencia psicofisiológica del orgasmo. Un orgasmo consiste, por lo general, en 10 a 15 contracciones, cuya tasa declina gradualmente durante el proceso orgásmico. Las primeras se dan con un intervalo medio de 0,6 segundos, intervalo que suele aumentar en 0,1 segundos por contracción. El semen comienza a expulsarse bruscamente desde el pene durante la primera o con la segunda contracción del orgasmo. Para muchos hombres, el primer eyaculado copioso sucede durante la segunda contracción



(Gerstenburg, 1990). Entre 8-12 segundos tras la expulsión se relaja la porción superior de la próstata y el cuello vesical observándose el paso a la vejiga de una pequeña fracción del eyaculado remanente en la uretra proximal (Gil-Vernet 1994; Nagai *et al.*, 2005; Böhlen *et al.*, 2000). Entender la fisiología de la eyaculación es importante en el momento de actuar sobre el paciente para lograr algún beneficio adicional encaminado a seleccionar los mejores espermatozoides. Los primeros espermatozoides en salir son aquellos que han completado la maduración del epidídimo y han pasado todos los filtros que supone esta estructura. En la fase de emisión, las contracciones del epidídimo distal nos introducen en los conductos deferentes y de allí pasan a las ámpulas de los conductos deferentes esperando la salida. En la eyaculación final, las primeras secreciones que produce la próstata son ricas en zinc y se utilizarán para estabilizar los puentes disulfuro de las protaminas presentes en el espermatozoide. Esto ayuda de manera eficaz al DNA para evitar que sea degradado o dañado en su camino hacia el óvulo. Por otra parte, los últimos impulsos de la eyaculación llevan los últimos espermatozoides arrastrados fundamentalmente por líquido de las vesículas seminales, con menos participación prostática y presentando peor calidad en cuanto a fertilidad. Los espermatozoides de la segunda fracción además están más expuestos al ambiente ácido de la vagina, ambiente que resulta menos favorable para ellos. Esta fracción tiene la posibilidad de estabilizar las protaminas con puentes de sulfuro, por lo que van a estar más afectados por el estrés oxidativo y por lo tanto son más susceptibles a ser dañados en su molécula de DNA, entrando con más facilidad en apoptosis. De esta manera esta segunda parte de la eyaculación acaba formando un pequeño tapón biológico durante un lapsus de tiempo hasta que es expulsado de la vagina cuando esta fase se haya licuado.

En los mamíferos y de modo natural lo que ocurre es que la primera parte del eyaculado alcanza más tempranamente el moco cervical, como lugar favorable para la supervivencia del espermatozoide. Esta fracción es la que va a aportar mejor calidad espermática de cara a la fertilidad. La última parte del eyaculado posiblemente en la naturaleza tenga una misión diferente y menos relacionada con carácter reproductivo directo del eyaculado. La segunda fracción parece estar más encaminada a formar una barrera biológica encaminada a bloquear la acción de un eventual eyaculado procedente de otro macho que

intentara fecundar a esa misma hembra. De esta forma el primer eyaculado impediría que no sea otro semen el que vaya a fecundar a la hembra con la que se ha tenido el encuentro sexual.

Por lo tanto, el semen ayuda a la fecundación por medio de dos cometidos completamente diferentes, uno intentando fertilizar el óvulo y otro intentando que, si falla la fecundación, evita que sea fecundada por otro semen diferente al del primer macho.

Por ello, manejar de una forma más fisiológica el eyaculado del macho y conocer bien el proceso reproductivo natural, puede suponer una mejora en los resultados de la reproducción asistida, ayudando a elegir el espermatozoide que con más probabilidad llevará al éxito reproductivo tras seleccionar el espermatozoide en la fracción óptima desde un punto fisiológico de acuerdo con esta perspectiva de la eyaculación.

## 4. LA CALIDAD DEL ADN Y LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA.

En la realización de la ICSI, donde tan sólo se requiere la selección de un espermatozoide para fertilizar un ovulo utilizando una inyección directa de ese espermatozoide seleccionado en el ovocito, algunos parámetros de la muestra eyaculada como la motilidad espermática, la concentración o el volumen del eyaculado no parecen relevantes para que el espermatozoide alcance el interior del ovocito y lo fecunde. La parte más importante que hace el espermatozoide es poner la información genética que aporta el varón al cigoto, por tanto se puede considerar al espermatozoide como un mensajero que se dedica a pasar información genética desde el testículo hasta el ovocito.

Hoy se sabe que hay ARNs acumulados en el citoplasma espermático para poner en marcha las señales que activen el óvulo en el momento de

comenzar los complejos procesos que den lugar a la formación del cigoto, pero la parte más trascendental del espermatozoide es el núcleo y la calidad del ADN integrada en él. Es en esta molécula donde reside el material genético que formará el nuevo cigoto. Es en este escenario donde la calidad del ADN del espermatozoide elegido adquiere una especial relevancia. A pesar de ello, este parámetro y su impacto en el éxito reproductivo está sometido a una constante controversia en la literatura (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2013). Incluso en el caso de los donantes de semen no es imperativo analizar aquellos parámetros que se relacionan con el daño que puede sufrir la molécula de ADN o la predisposición al daño que el donante pueda presentar en su eyaculado. Sin embargo, desde la implementación generalizada de la ICSI y teniendo en cuenta que, en el ámbito de las TRA, los espermatozoides se someten a procesos para-biológicos tales como centrifugaciones, lavados en medios fisiológicos o bien la congelación-descongelación, la calidad del ADN puede representar un nuevo parámetro a considerar como una prueba adicional con la que catalogar de forma más eficiente los donantes. En cualquiera de los casos, el éxito reproductivo en reproducción asistida ligada al varón siempre será dependiente de la eficiencia de las técnicas empleadas en el manejo del semen y de la selección que vamos a realizar de los espermatozoides. El hecho reproductivo es un fenómeno multifactorial en el que se implican a ambos miembros de la pareja. Por lo tanto, la evaluación de la integridad del ADN espermático se debería asumir como una pieza más de un complejo rompecabezas que abarca desde la condición fisiológica de los dos miembros de la pareja hasta la fertilización como el inicio del proceso reproductivo encaminado a formar una nueva forma de vida. Los test que evalúan la calidad del espermatozoide no sólo debieran identificar las capacidades cinéticas o del número de espermatozoides disponibles para alcanzar el ovocito, si no también deberían evaluar su capacidad de fertilizar ovocito, generar singamia y activar el crecimiento del embrión. Es decir, no sólo se debería contemplar al portador como tal, sino también su contenido, el ADN.

La fragmentación del ADN del espermatozoide (SDF: *Sperm DNA Fragmentation*) debería considerarse como un parámetro más en el momento de evaluar la calidad del eyaculado. Además, su determinación puede proporcionar

información beneficiosa en sucesos patológicos que afectan al paciente como son las situaciones de oligospermia severa (Esteves *et al* 2015). De esta forma, el concepto del daño en el DNA espermático adquiere cada vez más importancia dado que los niveles de deterioro observado en el ADN de los espermatozoides comprometen el éxito reproductivo (Zhao *et al.*, 2014; Gosálvez *et al.* 2015). En la mayoría de los estudios, se maneja el valor del daño como un concepto estático y que nos informa del porcentaje de espermatozoides que tienen la molécula de ADN fragmentada en una unidad de finita de tiempo (Gosálvez *et al.* 2015). Sin embargo, la SDF, lejos de ser un valor estático, tiende a aumentar a medida que el espermatozoide se procesa *in vitro* bajo condiciones para-biológicas. La pérdida de funcionalidad que experimenta el espermatozoide al ser manejado *in vitro* y que se relaciona con el impacto del llamado daño iatrogénico, puede afectar no sólo a la molécula de ADN, sino también a otras estructuras del espermatozoide tales como las membranas, el acrosoma o la actividad mitocondrial. Este fenómeno ocurre en todas las especies en las que se utilizan muestras de semen *in vitro* para inseminación (Gosálvez *et al* 2011) y de hecho este daño puede permanecer como no visible -daño críptico- por un periodo de tiempo que suele depender del agente que provoca el estrés (Santiso *et al* 2012) y de la condición genética del paciente. Particularmente, en el caso de los humanos, el impacto del daño iatrogénico sobre el ADN, se manifiesta como un valor creciente de la SDF a medida que las muestras seminales se manejan *in vitro* y que se detecta, de forma patente, durante 4 primeras horas de manejo de las muestras seminales (Gosálvez, 2009).

De esta forma, tras la descongelación de muestras criopreservadas en las que se valora el daño a lo largo de un período de tiempo variable, se observa un incremento diferencial del daño que está asociado, en principio, al individuo y este puede experimentar tasas de crecimiento desde tipo logarítmico hasta de tipo exponencial (Gosálvez *et al.*, 2009). De hecho, si traspasamos las barreras intra-específicas y comparamos las velocidades a las que se incrementa el daño en el ADN entre especies de mamíferos, encontraremos que las diferencias en el diseño del genoma y que se relacionan con la conformación final de las protaminas, estipulan la longevidad del ADN para una especie en cuestión (Gosálvez *et al* 2011). Por lo tanto, podemos aseverar que, cuando manejamos el

espermatozoide *in vitro*, encontraremos una longevidad diferencial de la molécula de ADN que se pone de manifiesto tanto en el nivel intra-específico como en el inter-específico.

## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO:**

**H1:** Los protocolos de recogida de muestra seminal que se aplican en la práctica clínica, aunque estén aceptados de forma consuetudinaria, no tienen por qué ser los que mejores resultados ofrezcan en cuanto a la calidad de la muestra recuperada, más aún considerando la evolución que han mostrado las TRA en los últimos 10 años.

**H2:** Debido a que en una micro-inyección sólo se requiere un espermatozoide, si la muestra seminal se somete a técnicas que reducen el nivel de fragmentación general de la población espermática, se esperarán notables mejoras en los resultados reproductivos en los casos de fallos de gestación dependiente de factor masculino.

**H3:** La observación de que en la naturaleza las diferentes fracciones del eyaculado cumplen distintas funciones biológicas sugiere que la composición y la calidad de los espermatozoides de las distintas fracciones de un mismo eyaculado pueden variar entre ellas. Por tanto, emplear la fracción que mejor características presente puede suponer un aumento en las tasas de éxito en las TRA.

**H4:** El nivel de fragmentación que presenta una muestra de semen tras ser recogida puede variar a lo largo del tiempo de incubación, pudiendo ser diferente de un sujeto a otro la velocidad a la que se deteriora.

# **3. OBJETIVOS**



El objetivo global de este trabajo es analizar qué estrategias son más eficaces para la selección del espermatozoide más adecuado que permita el éxito clínico en los resultados reproductivos. De este modo se pretende que la evidencia empírica, desde la aplicación del método científico, permita determinar si los paradigmas usados por analogía en la estandarización de la recogida de muestras son realmente los más apropiados y eficientes para conseguir el mejor espermatozoide para ser usado en las TRA.

En cada uno de los bloques se persigue lograr una mejora en la selección espermática para su uso en reproducción asistida tanto desde la actuación del Médico en la consulta como desde el Andrólogo en el laboratorio. Con esa finalidad se plantearon los siguientes objetivos y que trazan las líneas principales del esquema de trabajo de esta Tesis Doctoral:

- i) Determinar cómo se recuperan las mejores muestras seminales en lo referente a la calidad del material genético sin utilizar técnicas invasivas sobre el paciente o sobre la muestra seminal.
- ii) Estudiar la reducción del daño en el ADN tras la aplicación de técnicas específicas de tratamiento de las muestras *in vitro* (*Swim up*, o centrifugación en gradientes de densidad, IMSI o bien MACS) o técnicas invasivas (espermatozoides testiculares)
- iii) Analizar la distribución del daño en el ADN en muestras de pacientes y de donantes para establecer unos niveles de sensibilidad y especificidad asociados a este parámetro en el momento de analizar la calidad seminal de un paciente.

# **4. RESUMEN RESULTADOS**

Los resultados de las publicaciones presentadas en este trabajo de Tesis Doctoral determinan qué estrategias muestran mayor eficacia para seleccionar en una muestra seminal al espermatozoide más adecuado que permita el éxito clínico en los tratamientos de reproducción asistida en parejas estériles por un factor masculino. Se ha pretendido que la evidencia empírica, desde la aplicación del método científico, permita esclarecer si tanto los protocolos del Médico en la consulta como los del Andrólogo en el laboratorio son los más apropiados y eficientes para lograr el éxito en las Técnicas de Reproducción Asistida.

De forma más específica, en cada una de las publicaciones se ha llevado a cabo:

i)- la demostración empírica de mejoras estadísticamente demostradas en los protocolos de recogida de muestra seminal para su procesamiento y utilización posterior en técnicas de fecundación *in vitro* (Sánchez-Martín P *et al.*, 2013).

II)- el estudio de distintos parámetros en las diferentes fracciones de la muestra seminal, determinando cual es la de mejor pronóstico en resultados reproductivos para poder así implementar en la práctica clínica nuevas pautas de recolección logrando un mayor éxito en las técnicas de reproducción asistida (Hebles *et al.*, 2015).

III)- la realización de estudios comparativos de la integridad del ADN en la calidad seminal de los espermatozoides testiculares (extraídos directamente del testículo) frente a aquellos recogidos a través de la eyaculación (Esteves *et al.*, 2015).

IV)- estudios para modificar los protocolos de procesamiento en el laboratorio de las muestras seminales persiguiendo una mejor tasas de éxito en cuanto a la disminución del número de abortos espontáneos y/o incremento de nacimientos vivos sanos (Sánchez-Martín *et al.*, 2017).

V)- estudio de la cinética de fragmentación del ADN en distintos momentos tras la recogida de la muestra seminal para determinar cuál debe ser el tiempo máximo de espera para el procesamiento de una muestra antes de que disminuya notablemente su calidad. Del mismo modo, la determinación de nuevos parámetros que puedan ser aplicados para clasificar a los donantes de semen según su potencial de fertilidad (Tvrdá *et al.*, 2018).

Como puede observarse, en cada uno de los bloques abordados a través de las publicaciones presentadas se persigue lograr una mejora en la selección espermática. De modo general, por un lado en esta Tesis se ha llevado a cabo la demostración empírica de mejoras en los protocolos de recogida de muestra

seminal (Sánchez-Martín *et al.*, 2013; Hebles *et al.*, 2015) para ser implementados en la práctica clínica y lograr un mayor éxito en las técnicas de reproducción asistida. Se han realizado también estudios comparativos de la integridad del ADN en la calidad seminal de los espermatozoides testiculares (extraídos directamente del testículo) frente a aquellos recogidos a través de la eyaculación (Esteves *et al.*, 2015). Y por último se han realizado estudios para la mejora de los protocolos de procesamiento en el laboratorio en cuanto a la fragmentación del ADN espermático (Sánchez-Martín *et al.*, 2017) y de su velocidad de degradación tras la recogida de la muestra seminal (Tvrdá *et al.*, 2018) para determinar cuál debe ser el tiempo máximo de espera para procesar una muestra antes de que se vea afectada notablemente su calidad. Además estos datos obtenidos han permitido determinar nuevos parámetros que pueden ser aplicados para clasificar a los donantes de semen según su potencial de fertilidad.

# **5. DISCUSIÓN**

Dentro del campo de la medicina, y concretamente en el campo de la reproducción asistida, los profesionales sanitarios, médicos y biólogos, nos encontramos que tenemos que intervenir en un proceso biológico que en algunas parejas no funciona de la forma correcta y que, a consecuencia de ello, presentan una esterilidad. La intervención es necesaria puesto que el proceso fisiológico normal que funciona en otras parejas no lo está haciendo de la forma correcta en las que presentan una esterilidad. Cualquier intervención que se tenga que hacer en un proceso biológico tiene consecuencias. Lo que se pretende es que reviertan la alteración que está impidiendo la consecución del embarazo, pero en muchas ocasiones las intervenciones que realizamos pueden tener una serie de efectos indeseables. Además, por lo general las actuaciones que se realizan lo hacen con una metodología en la que no se han comprobado de forma experimental todos y cada uno de los pasos que se realizan en las mismas.

Hay situaciones en las que, como hemos visto en los trabajos precedentes, la asimilación de una serie de premisas sin validación científica puede tener efectos negativos. Un criterio pensado para uniformar el análisis de las muestras de semen en lo que es un seminograma, un tiempo previo de abstinencia de 2 a 5 días previo a la muestra, sin una validación previa se usó de forma rutinaria dentro de las normas que se indicaban para traer una muestra de semen que se utilizaría para fecundar. El error consiste en creer que un criterio que se usa para uniformar criterios, y evitar variabilidad en las diferentes muestras también era un criterio de calidad de la muestra de semen. Como este hay muchos ejemplos dentro de lo que es la medicina de la reproducción tales como evitar las relaciones sexuales durante el tratamiento, la realización de reposo después de la transferencia embrionaria o el mantenimiento de los tratamientos con testosterona.

Es cierto que en todas las ocasiones los resultados, por óptimos que nos parezcan, siempre serán susceptibles de ser mejorados, pero para ello son necesarias dos premisas i) la base bio-fisiológica que sustenta poder formular una hipótesis con una plausibilidad biológica y ii) desarrollar un trabajo de investigación que apoye las hipótesis que hemos formulado. Para intentar optimizar cualquier intervención que se quiera acometer es importante conocer a

fondo el proceso biológico sobre el que vamos a actuar ¿Cómo es su mecanismo de actuación? ¿Por qué evolutivamente ha llegado a ser de esa determinada forma y no de otra? Pero adicionalmente tendremos que ser conscientes de cuáles son las herramientas disponibles para la mejora del proceso y, si los resultados obtenidos realmente mejoran la situación que le precede. En ese enfoque es en el que se han planteado la línea de trabajo a partir de la cual se ha desarrollado esta Tesis Doctoral.

Como se ha referido en la introducción de esta Tesis, uno de los objetivos principales de nuestro grupo de trabajo se centra en localizar “el mejor espermatozoide posible” dentro de una muestra seminal con el que alcanzar el mayor éxito reproductivo cuando la infertilidad es dependiente del factor masculino. En este sentido, uno de los logros que se considera de mayor importancia en este trabajo es la demostración de que, con independencia de que se utilicen las técnicas tradicionales de selección espermática para reducir el nivel del daño en el ADN del espermatozoide, su combinación con otras estrategias de actuación previa sobre el paciente, como son la disminución de los tiempos de abstinencia o la utilización de la primera fracción del eyaculado, mejoran la proporción de espermatozoides que contienen ADN de buena calidad en la muestra seminal que se usará para fertilizar. Por otra parte, la incorporación de este tipo de acciones no solo es muy ventajosa para el paciente por su nulo nivel de agresividad si no que, en muchos casos, evitan que el paciente se someta a tratamientos más intensos y en algunos casos invasivos, que intentan paliar ese efecto negativo.

Aunque la mayoría de los trabajos que se incluyen en este trabajo de Tesis mantienen una orientación puramente clínica y encaminada a incrementar el rendimiento reproductivo de las parejas infértiles, en todos los supuestos se parte desde un enfoque al problema desde la ciencia básica y en esta perspectiva se abordan aquellos aspectos que puedan redundar en una mejor atención clínica al paciente. De ahí que parte de esta memoria presente diseños experimentales modificados encaminados a mejorar algunas estrategias de manejo del eyaculado con las que mejorar la capacidad de los clínicos para llevar a cabo la

transformación, tal y como se apuntaba en la introducción, de individuos estériles biológicos en fértiles asistidos.

Otro de los puntos que consideramos muy importantes es que las acciones experimentales que se proponen en las diferentes hipótesis no presentan ni un alto coste económico ni necesitan de un desarrollo tecnológico importante que impida su uso de forma generalizada. La mayor parte de las actuaciones que se proponen, a efectos de conseguir seleccionar el mejor espermatozoide son sencillas, baratas y fáciles de realizar.

Con objeto de discutir de forma coherente la esencia y logros plasmados en los distintos trabajos, se han establecido cuatro bloques de discusión global:

- I) Diseñar actuaciones no invasivas sobre el paciente para reducir los niveles de daño en el espermatozoide en situaciones críticas de recurrencia en fallo reproductivo, centrando la atención en los protocolos de recogida de la muestra y en la utilización de determinadas fracciones del eyaculado.
- II) Seleccionar casos críticos de infertilidad como son las oligospermias severas y dado su carácter invasivo se considera como el lado antagónico del punto anterior, para el estudio de la eficacia en la obtención de espermatozoides inmaduros con capacidad fertilizante directamente desde el testículo.
- III) Estudiar la eficiencia clínica de la utilización de protocolos de manipulación estándar de separación de espermatozoides combinada con técnicas de selección dirigida a células con marcadores apoptóticos como una estrategia válida de obtención de espermatozoide con baja tasa de daño en el ADN.
- IV) Analizar la cinética de fragmentación del ADN espermático a lo largo de su manipulación *in vitro* para determinar por cuánto tiempo puede la muestra preservar su integridad molecular y dilucidar la inclusión de este parámetro en la selección de donantes de esperma.



## ACTUACIÓN NO INVASIVA SOBRE EL PACIENTE

El protocolo clásico de recogida de la muestra seminal, consistente en una pauta de abstinencia de 2 a 5 días previos a la recogida de la muestra, fue una metodología diseñada para su aplicación en la clínica con el propósito de recuperar una muestra seminal con una mayor concentración espermática. Los espermatozoides una vez maduros tras el proceso de la espermiogénesis alcanzan la luz de los túbulos seminíferos desde donde son dirigidos hacia la *rete testis* y de aquí al epidídimo, llegando finalmente por los canales deferentes hasta a la vesícula seminal donde serán almacenados hasta su expulsión en el eyaculado. En el momento de la eyaculación se produce la contracción de la vesícula seminal y los espermatozoides son expulsados por el canal eyaculador hacia la uretra y luego hacia la parte exterior del pene. Se cuestionó que quizás la pauta de recogida de semen, implementada de forma tradicional en la clínica, no fuera la más apropiada para aquellos pacientes con un índice de fragmentación más elevado y en los que la integridad del ADN espermático se ve comprometida a corto plazo dado que no existen mecanismos de reparación de esa molécula una vez que el espermatozoide se ha formado.

Se aplicó entonces el método científico, sujeto a los principios de las pruebas de razonamiento, basándose en aspectos empíricos y de medida de resultados, para plantear la hipótesis de que los espermatozoides almacenados durante varios días antes de la eyaculación pueden sufrir una fragmentación del ADN adicional de su material genético, afectando severamente a la calidad global del eyaculado. El hecho de que un paciente presente una longevidad del ADN espermático comprometida justificaría que se intentase aplicar un protocolo de recogida en la que se minimice en lo posible el tiempo que los espermatozoides se encuentran en la vesícula seminal. Por todo ello se diseñó un estudio experimental en el que se comparasen las calidades espermáticas de pacientes con un alto grado de fragmentación de muestras recogidas siguiendo la pauta tradicional de 2 a 5 días de abstinencia, frente a una pauta en la que se había combinado eyaculaciones seriadas los 4 días previos y tan solo se hubieran guardado 12 horas de abstinencia antes de la recogida de la muestra seminal. En

esta primera aproximación a este planteamiento experimental (Sánchez-Martín et al., 2013- artículo nº 1 que se presenta en esta Tesis-) se demostró que los periodos de abstinencia largos no aportan ningún beneficio para la mejora de calidad de ADN de los espermatozoides incluidos en el eyaculado.

Estas conclusiones fueron reforzadas posteriormente con algunas contribuciones de otros autores siguiendo el diseño experimental publicado por nuestro grupo de trabajo para comprobar este hecho (Pons et al., 2013, Uppangala et al., 2016). Por lo tanto, podemos concluir y confirmar que las muestras recogidas tras una serie de eyaculaciones repetidas tras la aplicación de un protocolo estándar clásico de centrifugación en un gradiente de densidad, disminuye los valores de fragmentación del ADN espermático, siendo un 40% más eficaz que si no se contempla el periodo de abstinencia (Gosalvez et al., 2011).

La disminución de los valores de fragmentación del ADN espermático no solo tiene una importancia implícita en la calidad de la muestra que se utilizará para fertilizar el ovocito, sino que además se pudo comprobar cómo aumentan las tasas de éxito reproductivo usando muestras de semen sin mantener periodos de abstinencia clásicos. Una de las conclusiones generales que se extrae de esta serie de trabajos es que la eyaculación recurrente, si bien genera una disminución en el volumen de semen de aproximadamente 67%, produce una disminución de la SDF de un 27% tras la selección espermática. Sin embargo, no se apreció ninguna diferencia significativa en los valores asociados a los parámetros de motilidad y concentración de los espermatozoides. El resultado neto sobre el éxito reproductivo en 150 parejas control (sin realización de eyaculación recurrente) genera una tasa de embarazo superior a 10 puntos que en los casos de la abstinencia (56.4% en parejas sin abstinencia frente a un 43.3% en el caso de las parejas que realizaron la abstinencia;  $p= 0.030$ ). Estos datos de mejora de las tasas de fecundación y de desarrollo embrionario tienen su lógica basada en que para fecundar a un ovocito *in vitro* solo se requiere un espermatozoide, por lo que cualquier estrategia que reduzca la fragmentación del material genético de la población espermática del eyaculado, aunque suponga una disminución del volumen del eyaculado, va a permitir obtener mayor número de embriones

evolutivos en el total de micro-inyecciones realizadas. Con estos datos se pudo concluir que la eyaculación recurrente cada 24 horas durante cuatro días, con una abstinencia final de 12 horas y combinado con la selección de espermatozoides usando centrifugación en gradiente de densidad, produce un aumento significativo en el número de embriones evolutivos en ICSI.

El realizar una abstinencia previa a la eyaculación de 3-4 días provoca que en el epidídimo se acumulan muchos más espermatozoides que si se produce una depleción epididimaria tras eyaculaciones recurrentes. Como consecuencia de las eyaculaciones recurrentes se produce un incremento del número de espermatozoides inmaduros en el eyaculado, pero también provoca que los espermatozoides que son perfectamente maduros y que están disponibles para ser eyaculados estén libres de la concurrencia de daño en el ADN. Por otra parte, el hecho de que varios de los espermatozoides eyaculados sean inmaduros no supone un efecto negativo para la micro-inyección, ya que en la selección espermática que se realiza en la centrifugación en gradiente, las capas de diferente densidad permiten separar con facilidad los espermatozoides inmaduros, ya que al presentar la gota citoplasmática distal y cabezas con cromatina menos compacta, ofrecen una mayor superficie y, por tanto, mayor resistencia al desplazamiento en el gradiente (Gosálvez *et al.*, 2011; Uppangala *et al.*, 2016).

Esta práctica el resultado neto es que aumenta la probabilidad de seleccionar un espermatozoide libre de daño de ADN antes de realizar el ICSI. Sin embargo, también se debe tener en cuenta que, si bien la fragmentación del ADN de los espermatozoides en la población seleccionada se puede reducir después de estos procedimientos, todavía hay una posibilidad razonable de seleccionar de forma accidental un único espermatozoide que pueda mantener daño en su molécula de ADN. De forma paradójica, en algunos pacientes evaluados, el valor de la fragmentación era más elevado en la muestra seleccionada tras la eyaculación recurrente en comparación al nivel de SDF en la muestra de esperma en el eyaculado original. Este efecto ya se había constatado en otras situaciones de selección espermática (Gosálvez *et al.*, 2010; Santiso *et al.*, 2010). Este hecho puede tener su explicación en un efecto asociado a la manipulación errónea de la muestra de esperma durante la selección espermática tras realizar el proceso de

centrifugación en gradientes de densidad tal y como demostraron Gosálvez *et al.* (2011). Queremos resaltar que el incremento de los niveles de daño en el ADN espermático tras la manipulación del espermatozoide en el laboratorio, con respecto a los valores que presentaba el eyaculado original, es un hecho que se menciona de forma ocasional en la literatura, pero ocurre. De hecho, existen trabajos realizados aún pendientes de publicar en relación a la selección de espermatozoides mediante la técnica de MACS, en los que se describe que esta situación paradójica ocurre aproximadamente en un 10% de los casos procesados. Una de las formas de minimizar el impacto no deseado de esta circunstancia sería diseñar una estrategia previa a la selección espermática para intentar anticiparse a los resultados obtenidos por la aplicación de la técnica elegida en la muestra de esperma del paciente, previa a la fertilización. Por lo tanto, una de las estrategias posibles a realizar, especialmente cuando el paciente presenta un nivel de fragmentación elevado, es la realización de un test previo a la fecha en la que se vaya a necesitar la muestra para la fecundación de los ovocitos. De esta manera si la muestra usada para su análisis tiene un resultado de reducción del daño en el ADN satisfactorio, podría ser crio-preservada para su utilización opcional en el caso de que los resultados obtenidos en la muestra seleccionada en el día de la fertilización presente una peor calidad. En el caso de que el resultado de la fragmentación sea mayor al esperado se puede buscar una alternativa diferente para la preparación de la muestra de semen el día de la fecundación.

Del mismo modo que la pauta de recogida de la muestra influye notablemente en la reducción del daño del material genético de los espermatozoides, se planteó intentar buscar otras metodologías que permitan minimizar el nivel de fragmentación del ADN espermático. Por ello se consideró la posibilidad de estudiar si el empleo de las distintas fracciones del eyaculado podría tener también efectos sobre este parámetro. En los laboratorios de andrología el eyaculado se trata como un todo, tanto en el momento de la recogida de la muestra como en el procesado de ésta para seleccionar los espermatozoides necesarios para la fertilización. Sin embargo, la fisiología de la eyaculación completa en los mamíferos se compone de una serie de eyaculaciones fraccionadas desde que comienza el orgasmo y distribuidas en el tiempo total que

dura la eyaculación (Kareskoski et al. 2011). Debido a ello, al mezclar las diferentes fracciones se crea un ambiente ficticio en la muestra final que difiere de la que naturalmente existía en cada una de las fracciones, hecho que fisiológicamente tiene un efecto diferencial en las posibilidades que tienen los espermatozoides de las diferentes fracciones para pasar el cérvix, llegar hasta el útero y a la trompa donde se producirá la fecundación. Este tipo de recuperación en distintas fracciones sería una aproximación, en un ambiente clínico, de la realidad diseñada por la naturaleza, en la cual la primera fracción sería la encargada de alcanzar al óvulo ascendiendo por el cérvix y posteriormente por las trompas de Falopio. Los espermatozoides incluidos en la segunda fracción del eyaculado actuarían a modo de tapón fisiológico bloqueando la posible fecundación de la hembra por una segunda cópula de otro macho.

El plasma seminal de los mamíferos es un fluido altamente complejo y no solo actúa como portador de espermatozoides, si no también tiene una influencia directa en el desarrollo fisiológico del espermatozoide (Rodríguez-Martínez et al., 2011). Se han descrito más de 2000 proteínas en plasma seminal humano (Batruch et al. 2011) y, adicionalmente, tras caracterizar y comparar los proteomas del plasma seminal de siete mamíferos, se ha encontrado una gran diversidad proteómica entre ellas (Druart et al. 2013). En el total de eyaculado, la vesícula seminal aporta entre el 40% y el 60% del volumen del semen y este contiene principalmente: hormonas, fructosa, prostaglandinas (E2, A, B) fósforo y potasio. La próstata aporta, de forma variable y por eyaculado, entre un 15 -30% del plasma seminal y es un fluido rico en ácido cítrico, colesterol, fosfolípidos, carnitina, fosfatasas y oligoelementos tales como calcio, potasio, sodio y zinc. Adicionalmente contiene enzimas como la fibrolisina y la fibrinogenasa que se encargan de reducir residuos de sangre y fibras procedentes de diferentes tejidos. El último elemento que se agrega al semen es un fluido que secretan las glándulas uretrales de *Cowper* y *Littre* y que representan entre el 3-6% del total de eyaculado. Son estas glándulas las que aportan una proteína que actúa como lubricante, la secreción de estas glándulas sale muchas veces durante la primera fase de excitación sexual antes de que produzca el eyaculado para facilitar la salida del mismo.

El hecho de que los espermatozoides contenidos en la primera fracción del eyaculado presenten mejor potencial de fecundación se debe en parte a que contienen secreciones prostáticas ricas en fosfatasa ácida, magnesio y Zinc. Esta situación facilita la estabilización de los puentes disulfuro presentes en las protaminas y previene de una posible descondensación prematura de la cromatina. Por otra parte, se sabe que el ambiente de esta primera fracción del eyaculado es capaz de generar un buen nivel de inhibición de actividades endonucleasa que podrían dañar el DNA contenido en el espermatozoide (Arver 1982). Las secreciones de vesículas seminales presentan agentes quelantes, un pH alcalino y una baja disponibilidad de zinc. Todos estos efectores pueden afectar a la estabilidad de la cromatina y, por lo tanto, a la fragmentación del ADN (Arver 1982; Mortimer 1984).

Todo ello sugiere la importancia del fluido seminal en el momento de la reproducción, dado que incluso debe conferir a cada especie unas características acordes con su estrategia reproductiva. Pero incluso asumiendo la existencia una composición de plasma seminal especie-específica, parece que el papel biológico y el efecto sobre los espermatozoides repartidos entre las diferentes fracciones del eyaculado sería funcionalmente equivalente en diferentes especies. En el caso de los humanos, se conoce que menos de un 10% del volumen del semen de una eyaculación corresponde a los espermatozoides, quedando el resto catalogado como líquido seminal.

Las diferencias en composición del plasma seminal en las diferentes fracciones es una buena explicación de la observación realizada en estos estudios en los que se demuestra que la calidad del ADN de los espermatozoides que se recogen en la primera fracción es superior a la observada en la segunda fracción. Y esto ocurre independientemente de que estudiemos en pacientes con muestras seminales alteradas como en el caso de la oligospermia o la astenospermia o que este estudio se haga en individuos normozoospermicos (Hebles *et al.*, 2015-*artículo nº 2 que se presenta en esta Tesis-*). Tras la realización de este trabajo consideramos altamente recomendable recoger el eyaculado separando las dos fracciones en el momento de la toma de la muestra, dado que la presencia de los espermatozoides con mayor nivel de fragmentación incluidos en la segunda

fracción podrían interferir en las tasas de éxito de la TRA. De igual forma, este proceso de separación evitara que los espermatozoides de la primera parte no permanezcan en contacto con los metabolitos presentes en la segunda fracción.

Los resultados obtenidos referidos al éxito reproductivo son también interesantes al otorgar un papel de relativa importancia a los distintos parámetros de calidad seminal que se han manejado en este estudio: volumen, contracción, motilidad y fragmentación del ADN. Al tratarse de fertilizaciones realizadas con ICSI es el parámetro de la fragmentación es el que adquiere un papel más relevancia en el momento de explicar el éxito reproductivo logrado utilizando la primera fracción del eyaculado.

Desde un punto de vista evolutivo, es de total relevancia el hecho que hemos podido constatar en estos experimentos, al comprobar que la calidad del ADN encontrada en la primera fracción del eyaculado no es patrimonio de lo que ocurre en humanos. En especies muy distantes evolutivamente como el caballo, la situación es muy similar en todos los aspectos de mejora de la calidad espermática observados en la primera fracción. De hecho, las mejoras que se consigue en las dos especies, en lo que se refiere a la concentración espermática, a la motilidad o a los valores de fragmentación del ADN espermático, son equivalentes entre las dos especies al comparar la primera fracción con el eyaculado total (de la Torre *et al.*, 2017, Sánchez-Martín, *et al.*, 2017).

En su conjunto, los resultados presentados en esta investigación llevan a replantear si la práctica estándar de la recolección completa del eyaculado se puede considerar la mejor estrategia para usar gametos masculinos en reproducción asistida, siendo esta propuesta de mejora de los protocolos extensible a otras especies de mamíferos. En las dos especies aquí analizadas, el semen completo muestra características de calidad seminal inferiores a las presentes en la primera fracción. Por lo tanto, una de las propuestas derivadas de este trabajo sería la utilización de la primera fracción del eyaculado para propósitos de reproducción asistida. Esta práctica puede tener un efecto de sinergia en la mejora total de la calidad seminal si se combina con la práctica de eyaculaciones recurrentes, tal y como se ha discutido anteriormente.

## **PROTOSCOLOS DE EXTRACCIÓN: ESPERMATOSZOIDEOS TESTICULARES.**

Uno de los peores diagnósticos que se le pueden dar a un varón que consulta junto a su pareja por una esterilidad es la azoospermia. Este cuadro clínico constituye uno de los principales problemas relacionados con infertilidad dado que aproximadamente se estima que un 10% de las infertilidades de factor masculino se deben a azoospermia.

Existen dos tipos de azoospermia tipificados en andrología: la obstructiva en las que la producción de espermatozoides por el testículo está conservada, pero existe una obstrucción en el conducto de salida y la no obstructiva o secretora. En este último caso el problema se encuentra directamente en la producción de los espermatozoides por el testículo. La distinción entre ambas reside en parámetros clínicos, hormonales, resultados de ecografía, estudios histológicos y genéticos, pero en ambos casos tienen un factor común que es la ausencia de espermatozoides presentes en el eyaculado.

Existen dos problemas fundamentales en relación al manejo clínico de las azoospermias. La primera es el diagnóstico diferencial entre la azoospermia obstructiva y secretora, dado que no siempre es fácil discriminar entre ambas, e incluso que, si se llega al diagnóstico de azoospermia secretora, la actitud frente a la misma no siempre es clara. Salvo en casos concretos de alteraciones genéticas o problemas clínicos graves, con la existencia de unos testículos extremadamente pequeños o unos niveles hormonales muy alterados, la mayoría de las veces podemos encontrar un problema con la suficiente importancia como para que no se encuentren espermatozoides en el eyaculado, pero pueden existir focos de espermatogénesis conservada en el testículo. Por resumir se puede decir que si tenemos un diagnóstico de azoospermia obstructiva el manejo posterior es claro, una biopsia de testículo, pero para el resto de los casos existe una zona gris en la que el manejo de la misma no está estandarizado.



El manejo clínico de los cuadros de azoospermia tampoco es claro, salvo en la azoospermia obstructiva, puesto que las alteraciones hormonales o metabólicas encontradas en el estudio tienen unos resultados muy limitados para la obtención de espermatozoides en el eyaculado, en la mayoría de los casos. Es en parte por esta situación por lo que en los casos de sospecha de azoospermia secretora se propone la realización de una biopsia testicular que pueda servir como método diagnóstico y además, en el caso de obtención de espermatozoides, como fuente de obtención de los mismos en un número suficiente como para permitir realizar un ICSI y generar un embrión viable.

De forma paralela a la ausencia de espermatozoides en el eyaculado, existe otro grupo de individuos que se tipifican como oligospérmicos que se caracteriza por la presencia de pocos espermatozoides en el eyaculado. La oligozoospermia tiene diferentes grados de severidad, pero en general es un factor asociado a esterilidad dado que dificulta la posibilidad de conseguir un embarazo de forma natural. Se considera que un varón presenta un cuadro de oligospermia cuando la concentración espermática del eyaculado es inferior a 15 millones de espermatozoides/ml o menos de 39 millones en el total del eyaculado (Manual de la OMS 2010). En función de si la concentración es mayor o menor a este valor podemos tipificar tres niveles de severidad:

- i) Oligospermia leve: la concentración oscila entre 14 y 5 millones de espermatozoides/mL.
- ii) Oligospermia moderada: entre 5 y 1 millones de espermatozoides/mL.
- iii) Oligospermia severa: la concentración es menor de 1 millón de espermatozoides/mL.

Existe otro cuadro todavía más grave denominado “Criptozoospermia” en la que se encuentran espermatozoides, pero en una cantidad ínfima, de tal manera que algunas veces se confunde con la azoospermia. Se considera que hay una criptozoospermia si la concentración es menor de 100.000 espermatozoides/mL.

Con esa concentración la evaluación global de la calidad seminal queda seriamente comprometida.

En los cuadros de oligospermia severa, y en especial en la criptozoospermia, las posibilidades de éxito reproductivo disminuyen de forma dramática, con independencia de que seamos capaces de seleccionar un espermatozoide que cumpla las características morfológicas mínimas para ser utilizado para realizar una ICSI. Tanto en los cuadros de azoospermia como el de oligospermia severa, la utilización de espermatozoides testiculares puede suponer la única alternativa reproductiva para solucionar la esterilidad del varón.

Sin embargo, esta práctica médica tiene sus detractores, especialmente en el caso de los casos sin azoospermia, basándose en el hecho de que con la biopsia testicular nos saltamos un paso crítico de maduración del espermatozoide, que es el paso de este por el epidídimo. Hay teorías que indican que algunos de los fallos genéticos en el genoma del espermatozoide pueden estar asociados a errores en la meiosis o fallos que ocurren durante las primeras etapas de la compactación de la cromatina. Estos errores no son filtrados por el tránsito epididimario, donde parte de ellos serían eliminados. Esta situación incrementa la posibilidad de seleccionar un espermatozoide anormal mediante la biopsia testicular que, en condiciones de eyaculación normal, podría haber sido eliminado durante el proceso de maduración. De hecho, existen diferentes artículos en los que se compara la presencia de aneuploidias y en particular aquellos casos donde se presenta oligospermias, se obtiene una tasa mayor de aneuploidia y niveles no normales de metilación del ADN (Bernardini *et al.*, 2000; Calogero *et al.*, 2001; Chatziparasidou *et al.*, 2015).

Por lo tanto, si bien el uso de los espermatozoides testiculares permite conseguir embarazos con éxito en situaciones de necrozoospermia, criptozoospermia y oligozoospermia las implicaciones éticas de su uso es un tema abierto a debate en la bibliografía científica (Zini *et al.*, 2016) siendo necesario realizar y recopilar más datos de estudios bien diseñados para poder obtener conclusiones de su eficacia en TRA y sobre las consecuencias a largo plazo en los recién nacidos, si bien todas las evidencias existentes hasta el momento hablan de una normalidad de los mismos.

Siendo conocedores de estas premisas, una vez realizados todos los análisis pertinentes de pacientes con cuadros de criptozoospermia y oligozoospermia severa, se evaluó el riesgo asociado a cada paciente y con su consentimiento previo se realizó ICSI utilizando espermatozoides testiculares en parejas con fallo repetido de implantación usando diferentes estrategias reproductivas (Esteves *et al.*, 2015- artículo nº 3 que se presenta en esta Tesis). Los resultados muestran, de forma clara, que los niveles de fragmentación del ADN eran significativamente menores en las muestras de espermatozoides testiculares en comparación con sus equivalentes eyaculados. Por otra parte, los resultados de la ICSI fueron significativamente mejores en el grupo de pacientes que se utilizaron espermatozoides testiculares que en el grupo de pacientes en los que se utilizó espermatozoides del eyaculado. Este estudio se realizó de forma simultánea en dos centros diferentes y los resultados eran plenamente coincidentes; lo que sugiere que el uso de espermatozoides testiculares en pacientes oligospérmicos es una opción parcialmente efectiva para superar la infertilidad cuando se aplica a varones con un recuento muy bajo y niveles elevados de daño en el ADN espermático del eyaculado.

Esto no significa que en el caso de un diagnóstico de oligozoospermia severa o de criptozoospermia con una fragmentación del ADN elevada tengamos que cambiar la indicación de realización de una FIV-ICSI con espermatozoides de eyaculado, pero sí que parece ser lógica su prescripción en el caso de fallos repetidos previos. Este tipo de decisiones siempre se deben emplazar en el contexto de un estudio clínico previo en el que plantea, como una más, la opción de utilización de los espermatozoides de biopsia de testículo para fecundar los óvulos de la paciente y tratar así de solventar el problema de la esterilidad.

## **SELECCIÓN ESPERMÁTICA CON MACS**

La situación clínica de los pacientes seleccionados para este estudio concreto, era diferente a los casos anteriores. En este caso el objetivo del trabajo planteado era comprobar si pacientes con niveles elevados o muy elevados de

fragmentación en su ADN, pero que presentan una concentración espermática suficiente, se podrían ver beneficiados de una selección espermática utilizando anticuerpos monoclonales que tienen como diana espermatozoides que han entrado en una ruta de apoptosis (muerte celular programada).

Como ya hemos mencionado en la introducción, existen diferentes estrategias directas para seleccionar el mejor espermatozoide posible para su utilización en ICSI. El objetivo esencial de todas estas técnicas es reducir el número de espermatozoides con ADN dañado antes del procedimiento de ICSI (McDowell et al., 2014; Nasr-Esfahani y otros, 2012; Said et al., 2008; Sakkas, 2013). Las técnicas que se han mostrado eficientes para cubrir este objetivo son i) PICSI (ICSI fisiológico) donde se permite la selección de espermatozoides según la capacidad de estos para acoplarse a moléculas de ácido hialurónico en un medio controlado. Los espermatozoides que se seleccionan con PICSI, típicamente muestran una buena morfología, una baja frecuencia de aneuploidía y bajos niveles de fragmentación del ADN espermático (Nasr-Esfahani et al., 2008; Parmegiani et al., 2010). ii) IMSI (Selección espermática de alta magnificación) donde es posible la selección espermática de un espermatozoide de acuerdo con una morfología observada a altos aumentos. Mientras que algunos estudios han demostrado una fertilidad mejorada resultado cuando se usan espermatozoides seleccionados por IMSI ( Antinori *et al.*, 2008; Bartoov *et al.*, 2003; Hazout *et al.*, 2006), otros autores (Avendaño et al. 2009) indican que incluso los espermatozoides morfológicamente normales de hombres infértiles recuperados después de un procedimiento selección espermática, pueden mostrar una alta incidencia de fragmentación en su ADN.

Dentro de este compendio de posibilidades, donde no está establecido que tipo de pacientes pueden obtener un mayor beneficio al seleccionar espermatozoides mediante la morfología para hacer posteriormente una microinyección espermática, bien sea con una selección mediante morfología normal 400x o con alta magnificación 6000x, el uso de anticuerpos monoclonales para identificar células apoptóticas con marcadores conjugados con microesferas magnetizadas (MACS) supone una alternativa interesante a otros métodos de selección. La utilización de MACS permite realizar una selección negativa de los

espermatozoides más eficientes y eliminaría o al menos disminuiría los espermatozoides que contienen ADN dañado en el eyaculado. La técnica se puede utilizar sobre un eyaculado nativo o bien o después de que la muestra de esperma haya sido tratada por procedimientos de selección que incluyen lavado de esperma combinado con *swim-up* o con centrifugación en gradiente de densidad de (Alvares-Sedó *et al.*, 2010; Bucar *et al.*, 2015; De Vantery-Arrighi *et al.*, 2009; Rawe *et al.*, 2010).

Existe una amplia bibliografía publicada (Grunewald *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Alvares-Sedó *et al.*, 2010; Rawe *et al.*, 2010; Romany *et al.*, 2010; Tavalae *et al.*, 2012, Romany *et al.*, 2014) en la que se describe como la utilizando la metodología de las MACS se obtiene una mejora en:

- calidad global del esperma.
- tasa de fertilización.
- calidad del embrión.
- tasa de embarazo.

El éxito de este procedimiento reside en el hecho de que las MACS reduce el nivel de SDF (Herrero *et al.*, 2012; Rawe *et al.*, 2009) y que tiene la capacidad para diferenciar los espermatozoides apoptóticos de los no apoptóticos (Buzzi *et al.*, 2010; De Vantery-Arrighi *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Tavalae *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la técnica de MACS, combinada con gradientes de densidad, pueden reducir el nivel de SDF de forma más efectiva. No parece que el orden de procesado de la muestra influya en los resultados obtenidos.

El objetivo del estudio que realizamos con MACS fue determinar si el número de recién nacidos sanos podría incrementarse en las parejas que presentan un alto nivel de fragmentación mediante el protocolo estándar de centrifugación en gradientes de densidad, seguido por un tratamiento de la muestra recogida con el procedimiento de las MACS, frente a la utilización únicamente de un protocolo estándar de centrifugación en gradientes (Sánchez-Martín *et al.*, 2017- [artículo nº 4 que se presenta en esta Tesis](#)). El beneficio de los efectos del protocolo con o sin MACS se evaluó en dos grupos de pacientes:

- parejas que se sometieron a ICSI con los óvulos de la propia mujer, por tanto se tiene en cuenta el efecto edad
- parejas en las que se usaron ovocitos provenientes de donantes, en las que se elimina el efecto edad porque todas las donantes tienen menos de 30 años.

Tan solo se incluyeron varones que presentan  $\geq 30\%$  de ADN espermático fragmentado en el eyaculado dado que estos pacientes son los que, en teoría, van a tener una mejoría al ser tratados con MACS para reducir la proporción de espermatozoides que presentan daño. En total, se incluyeron 305 parejas en este estudio, y de estas, 216 mujeres se sometieron a una ICSI autóloga, mientras que las 89 restantes participaron en un programa de ICSI con donantes de ovocitos. Se determinaron las tasas de nacidos vivos y abortos espontáneos resultantes de la ICSI observada después del embarazo clínico.

En el estudio realizado no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que usaba MACS y el que no lo usaba, en relación a la tasa de recién nacidos vivos de las parejas sometidas a ICSI autóloga o ICSI con donante, independientemente de si el varón presentaba un nivel moderado ( $\geq 30$  a  $< 50\%$ ) o alto ( $\geq 50\%$ ) de daño en el ADN. Sorprendentemente, no se encontró evidencia de aborto en el grupo de pacientes en los que los espermatozoides se seleccionaron siguiendo el procedimiento MACS.

Por lo tanto, estos resultados indican que la eliminación de parte del daño presente en el eyaculado, si bien no redundaba en una diferencia significativamente estadística en el momento de un nacimiento final, sí que parece ser eficaz reduciendo el número de abortos dando lugar a la formación de embriones euploides que tendrán un desarrollo evolutivo.

## **TIPIFICACIÓN DE PACIENTES POR DINÁMICA DE DAÑO**

De forma habitual, cuando nos referimos a la fragmentación del ADN espermático lo hacemos como un valor absoluto, pudiendo llevar al concepto erróneo de que el mismo es constante. Pero esto no es así puesto que el tiempo que transcurre tras

la eyaculación y la inseminación, influye en el nivel de fragmentación del ADN espermático. Es lo que se conoce como daño iatrogénico.

Cuando tenemos un valor de porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado intentamos asimilarlo a los valores que el eyaculado presenta tras la recolecta de la muestra. Esto se podría considerar como una evaluación estática de la SDF, pero no están definidos los tiempos en los que se debe de trabajar con el semen para que esos niveles de fragmentación no se incrementen de forma que pueda ser perjudicial en relación a los resultados de embarazo.

Existe la posibilidad de evaluar el comportamiento de la fragmentación del ADN espermático de una manera dinámica. Es decir, cuantificar los valores de SDF a diferentes tiempos una vez que se ha realizado la eyaculación. Con este enfoque dinámico de la fragmentación logramos una estimación de la velocidad a la que el ADN espermático se fragmenta dependiendo del factor tiempo. Este tipo de estudios se pueden diseñar en condiciones experimentales en las que la variable única no sea el tiempo de incubación tras eyaculación. El diseño experimental puede contemplar la variabilidad de la velocidad del daño acumulado teniendo en cuenta otras variables tales como, temperaturas variables, medios de mantenimiento distintos o condiciones de almacenamiento diferentes tal y como supone la crio-preservación en sus diferentes modalidades.

El objetivo de este trabajo, considerado como un estudio prospectivo y el cual permitirá planificar otra serie de aproximaciones experimentales, era estudiar como varía la longevidad del ADN espermático en muestras de donantes de semen que han sido crio-preservadas (Tvrdá *et al.*, 2018 *-artículo nº 5 que se presenta en esta Tesis-*).

De acuerdo a los datos obtenidos de este trabajo se concluye que el ADN de los espermatozoides de los donantes muestra 2,5 veces más longevidad en comparación con el de los pacientes, lo que se considera lógico ya que los donantes se seleccionan precisamente por unas mejores características seminales clásicas. De la misma forma, se estimó que la SDF aumenta de 2,3 unidades de daño por hora, durante las 2 primeras horas de incubación. En su

conjunto, todos los resultados muestran que es posible diferenciar, con niveles de aproximadamente un 70% de sensibilidad y un 80% de especificidad, individuos que se comportan como donantes o pueden ser considerados como pacientes utilizando la fragmentación estática y los valores de daño asociados tras 2 horas de incubación a 37°C.

En este trabajo se propone un nuevo parámetro denominado la Tasa de Daño Combinado (RCD) definido como el producto del valor de la SDF a tiempo cero (valor estático) por el aumento en el daño registrado durante las primeras 2 horas de incubación. De esta forma, se pudo comprobar que el índice de RCD = 22.2 unidades presenta una capacidad de identificación de donantes con una sensibilidad del 78% y una especificidad de un 77%. Este punto de corte podría utilizarse para caracterizar donantes con alta resistencia al daño en la cromatina y podrían ser recomendados como valor umbral para su uso en inseminación intrauterina o en FIV.

Como se ha señalado en la introducción, en los últimos años, numerosos estudios destacan la asociación entre la integridad del ADN del esperma y la fertilización (Jin *et al.*, 2015), fallos de implantación y (Simon *et al.*, 2014), abortos involuntarios (Coughlan *et al.*, 2015), nacimiento de niños con defectos genéticos y epigenéticos y correlación con procesos oncológicos de desarrollo temprano infantiles. La mayoría de estas conclusiones se derivan de una evaluación estática del daño presente en el ADN con valores obtenidos después de la eyaculación. Tal y como recogemos en este experimento, parte de este daño puede producirse como un efecto de daño iatrogénico sensiblemente incrementado tras la manipulación *in vitro* de las muestras (Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, *et al.*, 2009; Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, *et al.*, 2009). Por lo tanto, consideramos importante que se evalúe la dinámica de fragmentación en el ADN espermático para predecir las tasas de daño acumulado que el paciente puede experimentar en sus muestras seminales por manejo *in vitro*. Si detectamos muestras con ADN inestables, esta información nos ayudaría a rediseñar los protocolos de manipulación de esas muestras seminales con el objetivo de minimizar todo lo posible, en el laboratorio de FIV, el tiempo transcurrido entre la eyaculación y la fertilización del ovocito.



Esta visión dinámica de la calidad del espermatozoide también nos permite considerar la posibilidad de que determinadas muestras de semen sean utilizadas para realizar inseminaciones intrauterinas si detectamos una gran estabilidad en el ADN del eyaculado. Este aspecto, en humanos, tiene relevancia no solo en inseminación intrauterina, si no en FIV, ya que deberíamos asumir que igual que se requiere una elevada estabilidad ADN en los espermatozoides inseminados que tienen que atravesar todo el tracto genital femenino hasta que en la trompa se pueden encontrar con un ovocito maduro, es necesaria una estabilidad en la fragmentación del ADN espermático cuando al mismo lo colocamos en una placa para realizar una FIV convencional en el laboratorio, dado que no controlamos el tiempo en el que el espermatozoide va a penetrar la zona pelúcida. De hecho, existen estudios en modelos animales y utilizando características de longevidad del ADN espermático que señalan que las tasas de fecundación van disminuyendo en los casos en los que la fragmentación del ADN se incrementa a velocidades elevadas. Por el contrario, mientras que los machos con mayores niveles de estabilidad en su ADN muestran mayores niveles de éxito reproductivo. Es interesante resaltar que las tasas de fertilización no se ven afectadas al comparar grupos de alta o baja estabilidad en el ADN, pero los embriones derivados de los animales con mayor estabilidad en su ADN son de mejor calidad. Hay algunos estudios en el caso de humanos donde la pérdida por daño iatrogénico de la calidad del ADN se generaría con el desplazamiento de muestras entre centros diferentes para realizar inseminación artificial con la entrega de semen transcurridas 24 h, esta pérdida de calidad del semen debido al incremento de la fragmentación con el tiempo se traduce en una menor tasa de embarazo y un incremento de la tasa de abortos (Young *et al.*, 2003). Este nuevo factor de la longevidad del ADN espermático supone un nuevo enfoque para caracterizar el eyaculado en el laboratorio de andrología, informando sobre una mejor evaluación de la muestra que nos permita identificar de forma más precisa la técnica de fertilización más eficiente para cada pareja. Este aspecto tiene mucha importancia en el momento de tipificar a individuos de acuerdo con la calidad del ADN y sobre todo en su capacidad de preservar la integridad de su ADN en el tiempo. Si bien en este trabajo se hace referencia a donantes de semen, las conclusiones pueden ser aplicables a cualquier tipo de paciente.

# **6. CONCLUSIONES**

- 1) Las eyaculaciones recurrentes, en oposición a los métodos tradicionales de abstinencia, en combinación con la selección espermática tras centrifugación en gradientes de densidad, genera un descenso en el nivel de fragmentación del ADN espermático en la muestra recuperada para fertilizar cercana al 30%.
- 2) Las eyaculaciones recurrentes con un protocolo de 4 días de eyaculación cada 24h y una abstinencia final de 12 horas tras la última eyaculación, incrementa estadísticamente el éxito reproductivo utilizando ICSI.
- 3) La primera fracción de los eyaculados presentan niveles de daño en el ADN espermático estadísticamente inferiores a las observadas en la muestra total que incluye todas las fracciones del eyaculado.
- 4) La disminución de los niveles de daño en el ADN del espermatozoide en la primera fracción del eyaculado, parece ser un efecto compartido por otras especies de mamíferos y el comportamiento de mejora asociado a otras características seminales tales como, el volumen, la concentración, la motilidad y la fragmentación del ADN, muestran un comportamiento equivalente en especies distantes evolutivamente tales como el caballo y los humanos.
- 5) La utilización de espermatozoides testiculares en pacientes que presentan oligospermia severas mejoran los resultados de éxito reproductivo y reducen la posibilidad de aborto.
- 6) En pacientes que presentan elevados niveles de fragmentación en sus eyaculados, la utilización de MACS reduce de manera estadísticamente significativa la incidencia de aborto.
- 7) El nivel de daño en el ADN espermático observado en pacientes es 2 veces superior al observado en pacientes.

- 8) Los donantes de esperma muestran una longevidad del ADN 2,5 veces superior a la observada en pacientes.

# **7. BIBLIOGRAFÍA**

Abhyankar N, Kathrins M, Niederberger C. Use of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with cryptozoospermia: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2016;105:1469–1475).

Alvarez Sedó, C. Uriondo, H. Lavalpe, M. *et al.*, Clinical outcome using non-apoptotic sperm selection for ICSI procedures: report of 1 year experience. 2010. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.07.902.

Amirjannati N, Heidari-Vala H, Akhondi MA, *et al.*, Comparison of intracytoplasmic sperm injection outcomes between spermatozoa retrieved from testicular biopsy and from ejaculation in cryptozoospermic men. *Andrologia*. 2012. 44 Suppl 1:704-709.

Mehta A, Bolyakov A, Schlegel PN, *et al.*, Higher pregnancy rates using testicular sperm in men with severe oligospermia. *Fertil Steril*. 2015;104:1382–1387.

Antinori M, Licata E, Dani G, *et al.*, Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online*. 2008. 16: 835-41.

Balaban B, Yakin K, Alatas C, *et al.*, Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2011. 22:472-6.

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.

Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli C, Cavani S, Gaggero G, Tindiglia C, Ragni N, Venturini PL. Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum Reprod*. 2000.15: 2165–2172.

Bedau M, Cleland CE.. La esencia de la vida: Enfoques clásicos y contemporáneos de filosofía y ciencia. Fondo de Cultura Económica. 2016. Colección ciencia y tecnología ISBN: 9786071624550.

Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, *et al.*, Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome?. 2006. Hum Reprod. 21: 1787-90.

Böhlen D1, Hugonnet CL, Mills RD, *et al.*, Five meters of H<sub>2</sub>O: The pressure at the urinary bladder neck during human ejaculation. Prostate. 2000. 44: 339-41.

Buzzi F, Xu L, Zuellig RA, *et al.*, Differential effects of protein kinase B/Akt isoforms on glucose homeostasis and islet mass. Mol Cell Biol. 2010. 30:601-12

Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, *et al.*, Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. Hum Reprod. 2001. 16:1172–1179.

Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, *et al.*, A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. Fertil Steril. 2009. 92:1616-25.

Cassuto NG, Hazout A, Bouret D, *et al.*, “Lowbirth defects by deselecting abnormal spermatozoa before ICSI,” Reproductive BioMedicine Online. 2014. 28:47-53.

Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, *et al.*, Alkalilabile sites in sperm cells from Sus and Ovis species. International. Journal of Andrology. 2008. 31: 354–363.

De Vantéry Arrighi C, Lucas H, Chardonens D, *et al.*, Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. Reprod Biol Endocrinol. 2009. doi: 10.1186/1477-7827-7-1.

De Vos A, Van De Velde H, Joris H, *et al.*, Influence of individual sperm morphology on fertilisation, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2003. 79: 42–48.

Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, *et al.*, Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Hum Reprod.* 1995. 10:2960–4.

Duty SM, Narendra PS, Manori JS, *et al.*, The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ Health Perspect.* 2003. 111: 1164–1169.

Esteves SC, Gosálvez J, López-Fernández C, *et al.*, Diagnostic accuracy of sperm DNA degradation index (DDSi) as a potential noninvasive biomarker to identify men with varicocele-associated infertility. *Int Urol Nephro.* 2015. 247:1471–1477.

Gerstenburg, T. C. "Erection and ejaculation in man. Assessment of the electromyographic activity of the bulbocavernosus and ischiocavernosus muscles", *British Journal of Urology.* 1990. 65: 395-402.

Gil-Vernet JM, Alvarez-Vijande R, Gil-Vernet A *et al.*. Ejaculation in men: a dynamic endorectal ultrasonographical study. *Br J Urol.* 1994. 73:442-8.

Giuliano F and Clément P. Physiology of ejaculation: emphasis on serotonergic control.; *Eur Urol.* 2005. 48:408-17.

*Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. Mol Hum Reprod.* 1999. 5: 109-15.



Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez E, Nuñez R, *et al.*, A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril.* 2009. 92: 1915-9.

Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, *et al.*, Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev.* 2011. 78: 951-61.

Gosálvez J, Migueles B, López-Fernández C, *et al.*, Single sperm selection and DNA fragmentation analysis: the case of MSOME/IMSI. *Natural Sciences.* 2013. DOI:10.4236/ns.2013.57A002.

Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, *et al.*, Unpacking the mysteries of sperm DNA fragmentation: ten frequently asked questions. *J Reprod Biotech Fertil.* 2015. 4 : 1-16.

Huang J, Huen MS, Kim H, RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nat Cell Biol.* 2009.11:592-603.

Hugonnet CL, Böhlen D, Schmid HP. Le profil éjaculatoire : une pression de 5 mètres H<sub>2</sub>O au niveau du col vésical lors de l'éjaculation ; *Progrès en Urologie.* 2002. 12: 1240-1243.

J. de la Torre, P. Sánchez-Martín, J. Gosálvez, F. *et al.*, Equivalent seminal characteristics in human and stallion at first and second ejaculated fractions *Andrologia.* 2017. DOI: 10.1111/and.12708.

Jean M, Boudineau M, Tatin C, *et al.*, Intracytoplasmic sperm injection with polyvinylpyrrolidone: a potential risk. *Fertil Steril.* 2001. 76:419–20

Jin L, Zhang K, Xu Y, *et al.*, Sequestration of mRNAs Modulates the Timing of Translation during Meiosis in Budding Yeast. *Mol Cell Biol.* 2015. 35:3448-58.

Lessells C.M., Snook R.R., Hosken D.J. The evolutionary origin and maintenance of sperm: selection for a small, motile gamete mating type. In *Sperm biology: An evolutionary perspective*. Ed. Birkhead T.R., Hosken D.J., Pitnick S. 2009. 43-67. London, Academic press-

Levin R. Physiology of orgasm. In: Mulhall JP, Incocci L, Goldstein I, Rosen R, editors. *Cancer and sexual health*. Ed. Springer Science. 2011. 35–48.

Lingam M. Analytical approaches to modelling panspermia – beyond the mean-field paradigm. *Mon Not R Astron Soc*. 2016. 455: 2792-2803.

López-Fernández C, Johnston SD, Gosálbez A, *et al.*, Inter-center variation in the efficiency of sperm DNA damage reduction following density gradient centrifugation *Natural Sciences*. 2013. DOI:10.4236/ns.2013.57A003

Mark Ridley *Evolution*. Blackwell Science. 2004. 751 pp., 3rd Edition

McDowell IC., Nikapitiya C, Aguiar D, *et al.*, Transcriptome of American Oysters, *Crassostrea virginica*, in Response to Bacterial Challenge: Insights into Potential Mechanisms of Disease Resistance. *Plos One*. 2014. doi.org/10.1371/journal.pone.0105097

Meeker, JD. Maity, A Missmer, SA *et al.*, Serum Concentrations of Polychlorinated Biphenyls in Relation to in Vitro Fertilization Outcomes. *Environ Health Perspect*. 2011. 119:1010-1016.

Mitchell V, Rives N, Albert M, *et al.*, Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities. *Hum Reprod* 2006. 21: 2065–2074.

Nagai A, Watanabe M, Nasu Y, *et al.*, Analysis of human ejaculation using color Doppler ultrasonography: a comparison between antegrade and retrograde ejaculation. *Urology*. 2005. 65:365-8.

Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalae M. Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. *Fertil Steril.* 2008. 89:892-8.

O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, and Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril.* 2010. 93:1-12.

Parker, G.A.; Baker, R.R.; Smith, V.G.F. The origin and evolution of gamete dimorphism and the male-female phenomenon. *Journal of Theoretical Biology.* 1972. 36: 529–553.

Parker, G.A. Selection on non-random fusion of gametes during evolution of anisogamy. *Journal of Theoretical Biology.* 1978. 73: 1–28.

Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet.* 2009. 27:13-6.

Parrish, C. R., O'connell, P. H., evermann, J. F. *et al.*, Natural variation of canine. parvovirus. *Science.* 1985. 230: 1046-1048

Pitnick, S and Markow, TA. Large-male advantages associated with costs of sperm production in *Drosophila hydei*, a species with giant sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994. 91: 9277–81.

Rawe VY Y Chemes H. Exploring the cytoskeleton during intracytoplasmic sperm injection in humans. *Methods Mol Biol.* 2009. 518:189-206.

Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedó C, *et al.*, Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2010. 20:320-3.

Gosalvez J, Gonzalez-Martinez M, Lopez-Fernandez C, *et al.*, Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril.* 2011. 96:1083–1086.

Pons I, Cercas R, Villas C, *et al.*, One abstinence day decreases sperm DNA fragmentation in 90 % of selected patients. *J Assist Reprod Genet.* 2013. 30:1211–1218.

Uppangala S, Mathai SE, Salian SR, *et al.*, Sperm chromatin immaturity observed in short abstinence ejaculates affects DNA integrity and longevity in vitro. *PLoS One.* 2016. 11:e0152942.

Sánchez-Martín P, Sánchez-Martín F, González-Martínez M *et al.*, Increased pregnancy after reduced male abstinence, *Syst Biol Reprod Med.* 2013. 59:256-60.

Chatziparasidou A, Christoforidis N, Samolada G, *et al.*, Sperm aneuploidy in infertile male patients: a systematic review of the literature. *Andrologia.* 2015. 47:847–860.

Reijo R1, Lee TY, Salo P *et al.*, Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet.* 1995.10:383-93.

Revenig L, Leung A, and Hsiao W. Ejaculatory physiology and pathophysiology: assessment and treatment in male infertility. *Transl Androl Urol.* 2014. 3:41-9.

Sakkas D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2013. 99:1023-9.

Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, *et al.*, DNA fragmentation dynamics allows the assessment of cryptic sperm damage in human: Evaluation of exposure to ionizing radiation, hyperthermia, acidic pH and nitric oxide. *Mutation Research.* 2012. 734: 41– 49.

Nasr Esfahani MH y Tavalae M. Origin and role of DNA damage in varicocele. *Int J Fertil Steril.* 2012. 6:141-6.

Tesarik J, Hazout A, Mendoza-Tesarik R, *et al.*, Beneficial effect of luteal-phase GnRH agonist administration on embryo implantation after ICSI in both GnRH agonist- and antagonist-treated ovarian stimulation cycles. *Hum Reprod* 2006. 21:2572-9.

Zariwala MA, Leigh MW, Ceppa F, *et al.*, Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia: evidence of founder effect in a common mutation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006. 174:858-66.

Zhao S , Fung-Leung WP, Bittner A, *et al.*, Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. 2014. doi.org/10.1371/journal.pone.0078644

Vasas V, Szathmáry E, Santos M. Lack of evolvability in self-sustaining autocatalytic networks constraints metabolism-first scenarios for the origin of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. 107:1470-5.

Wallis MC1, Waters PD, Graves JA. Sex determination in mammals--before and after the evolution of SRY. *Cell Mol Life Sci*. 2008. 65:3182-95.

Yuan L, Liu JG, Zhao J, *et al.*, The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell*. 2000. 5:73-83.

Zariwala MA, Leigh MW, Ceppa F, *et al.*, Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia: evidence of founder effect in a common mutation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006. 174:858-66.

Zhao J, Zhang Q, Wang Y, *et al.*, Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2014. 102 : 998-1005.

Zini A, Bach PV, Al-Malki AH, *et al.*, Use of testicular sperm for ICSI in oligozoospermic couples: how far should we go? Hum Reprod. 2016. 32:7-13.

**Anexo I:**

**ARTÍCULOS ORIGINALES**

## Increased pregnancy after reduced male abstinence

Pascual Sánchez-Martín, Fernando Sánchez-Martín, Mercedes González-Martínez & Jaime Gosálvez

To cite this article: Pascual Sánchez-Martín, Fernando Sánchez-Martín, Mercedes González-Martínez & Jaime Gosálvez (2013) Increased pregnancy after reduced male abstinence, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 59:5, 256-260, DOI: [10.3109/19396368.2013.790919](https://doi.org/10.3109/19396368.2013.790919)

To link to this article: <https://doi.org/10.3109/19396368.2013.790919>



Published online: 08 May 2013.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 213



View related articles [↗](#)



Citing articles: 14 View citing articles [↗](#)



RESEARCH ARTICLE

## Increased pregnancy after reduced male abstinence

Pascual Sánchez-Martín<sup>1</sup>, Fernando Sánchez-Martín<sup>1</sup>, Mercedes González-Martínez<sup>1</sup>, and Jaime Gosálvez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Ginemed Clinic, Sevilla, Spain, <sup>2</sup>Department of Biology, Genetics Unit, University Autónoma of Madrid, Madrid, Spain

This study was conducted to test the hypothesis that continuous epididymal sperm depletion after recurrent ejaculations (REC) in contrast to a period of abstinence (ABS) results in a decreased level of sperm DNA fragmentation (SDF) and a consequent increased rate of pregnancy. Forty couples undergoing intra-cytoplasmic injection (ICSI) were asked to abstain from ejaculation for a period of 4 days and then ejaculate once per day for a period of 4 days, followed by a period of abstinence for 12 hours; sperm samples obtained after ABS and REC were assessed for volume, concentration, motility, and SDF and compared in 25 of the patients. Additionally, and in a different experiment, the pregnancy rate of this experimental group (40 couples) was compared to a control group of 150 couples in which the males had abstained from ejaculation for 4 days prior to ejaculation. Sperm selection was performed using density gradient centrifugation prior to ICSI. Semen quality in the REC group that was assessed over the course of the ejaculation schedule showed a decrease in semen volume (67%) and SDF (27%) following sperm selection; there was no difference for sperm motility or sperm concentration. When the pregnancy rate between the 40 couples in the REC group and 150 couples in the control ABS group were compared, the REC group had a pregnancy rate of 56.4% (25/40), whereas the ABS rate was only 43.3% (65/150) ( $p = 0.030$ ). We conclude that recurrent ejaculation every 24 hours for four days with a final abstinence of 12 hours, combined with sperm selection using density gradient centrifugation, produces a significant increase in pregnancy rate when using ICSI. As ICSI was the strategy selected for fertilization, we propose that the observed reduction in SDF was the primary factor leading to improved reproductive outcome.

**Keywords** assisted reproduction, fertility, male factor, sperm DNA fragmentation

**Abbreviations** SDF: sperm DNA fragmentation; REC: recurrent ejaculations; ABS: abstinence period; ICSI: intra-cytoplasmic injection; ART: assisted reproductive techniques; SCA: sperm characteristics assessment.

### Introduction

Various strategies are now available to reduce the level of sperm damage in the ejaculate. When intra-cytoplasmic injection (ICSI) is selected for fertilization, most preparatory techniques involve *ex vivo* selection of a low number of spermatozoa containing the best possible DNA molecule. Thus, the use of magnetic cell sorting with annexinV-conjugated microbeads to target and remove apoptotic or apoptotic-like spermatozoa has now become fashionable [Said et al. 2006]. The use of testicular sperm retrieval is also attracting interest because it is claimed that the level of sperm DNA fragmentation (SDF) is lower than that found in the ejaculate [Greco et al. 2005]. Furthermore, this is the only way patients with severe oligospermia are able to obtain functional syngamy. While high resolution microscopy for selection of better sperm morphology [Bartoov et al. 2003; Antinori et al. 2008] and hyaluronic acid based diluents for the best physiological conditions [Huzar et al. 2003] allow indirect selection of the most capable sperm along with the quality DNA, treatments such as the use of the magnetic beads can potentially lead to compromises in physiological homeostasis of the sperm cell [Salian et al. 2012]. This may well produce cryptic levels of iatrogenic sperm damage that could compromise the reproductive outcome [Goudakou et al. 2012].

While we may expect further advances in these proven technologies, we propose that other less invasive protocols based on an understanding of simple physiology and mechanical manipulation of the sperm cell can be equally, if not more effective in improving outcomes for assisted reproduction technology (ART); this includes the use of recurrent ejaculation to improve standard seminal characteristics [Levitas et al. 2005], and SDF [Gosálvez et al. 2011]. While it might seem logical and intuitive for the male patient to undergo a period of abstinence for 3 to 4 days prior to using his sperm in ART so as to increase the volume and number of spermatozoa available for fertilization, there is currently no medical evidence to support such a claim. The lack of DNA repair in the maturing sperm means that the passage of the ejaculate

Received 10 December 2012; revised 14 January 2013; accepted 12 February 2013.

\*Address correspondence to Jaime Gosálvez, Ph.D., Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Biología, Darwin sn, Madrid 28049, Spain. E-mail: jaime.gosalvez@uam.es

down the epididymis and its accumulation in the caudal region of the epididymis is a physiological necessity for sperm maturation and future capacitation, but it has no beneficial effect on the DNA molecule. Furthermore, a long period of storage and accumulation of sperm in the cauda epididymidis may expose it to increased damage associated with oxidative stress or even to enzymes released by degenerating spermatozoa with ruptured membranes.

The present experiment was conducted to test the hypothesis that continuous epididymal sperm depletion, using recurrent ejaculations (REC), results in a decreased level of sperm DNA damage when compared to sperm recovered after abstinence (ABS) and this can lead to an increased chance of pregnancy in an ICSI fertilization setting. We propose that when using ICSI sperm, DNA fragmentation is likely to be the most important variable for improving and predicting reproductive outcome, as parameters such as critical sperm concentration, poor membrane quality, sperm motility, or incomplete sperm capacitation are unlikely to be directly invoked as limiting factors for the fertilization of a female gamete.

## Results

Twenty-one of the 40 patients in the REC group were able to follow the prescribed ejaculation schedule in order to examine changes in seminal characteristics and SDF (Table 1). The Wilcoxon signed-rank test for a non-parametric analysis when comparing two related samples showed that there were significant differences in volume ( $Z = -3.929$ ;  $P 0.000$ ) and SDF ( $Z = -3.991$ ;  $P 0.000$ ) between the first ejaculate after 4 days ABS and following 4 days of

REC; seminal volume reduced by 67% and SDF decreased by approximately 27%. There was no difference in sperm concentration ( $Z = -0.355$ ;  $P 0.723$ ) or sperm motility ( $Z = -1.064$ ;  $P 0.278$ ).

A correlation analysis was performed (Spearman Rho) to gauge the extent to which increases or decreases in one variable mirrored those in the other variable when ABS and REC values are compared. Values obtained for ABS and REC were positively correlated when volume (Spearman-Rho: 0.676;  $P 0.01$ ), concentration (Spearman-Rho: 0.800;  $P 0.01$ ), and SDF (Spearman-Rho: 0.953;  $P 0.01$ ) were compared. The correlation was low and not significant when values for sperm motility were compared (Spearman-Rho: 0.360;  $P 0.109$ ). While not of clinical relevance, especially under an ICSI protocol, these results suggest that values for the different variables obtained during ABS could be considered as predictive of those that will be obtained during REC.

The pregnancy rate observed by fetal heartbeat in the REC experimental group was 56.4% (25/40). In comparison, the control group which used sperm from males after a 4 day period of abstinence based on clinic records for similar reproductive scenarios had a pregnancy rate of 43.3% (65/150); this represented a significant ( $\chi^2 4.65$ ;  $df 1$ ;  $p = 0.030$ ) increase in pregnancy rate of around seven percentage points.

## Discussion

This study has revealed that spermatozoa recovered following recurrent ejaculation in human patients every 24 hours for four days with a final abstinence of 12 hours and in combination with sperm selection using density gradient

Table 1. Data and basic descriptive statistics for volume (Vol: ml), concentration (Con: millions per ml), motility (Mot: percent of progressive motility), and sperm DNA fragmentation (SDF: % of sperm DNA fragmentation). The results represented 21 out of 40 patients that were able to provide ejaculates after 4 days of abstinence (ABS) followed by 4 days of recurrent ejaculation (REC).

Patient	Vol-ABS	Vol-REC	Con-ABS	Con-REC	Mot-ABS	Mot-REC	SDF-ABS	SDF-REC
1	2.8	1.2	25	20	38	12	31	22
2	1.5	0.6	16	7	58	42	38	30
3	2.6	0.6	80	65	60	21	36	25
4	4	1.2	62	90	45	49	41	32
5	3.5	3.4	41	22	42	71	16	8
6	8	2.4	26	51	53	60	35	27
7	3.2	1.8	50	75	52	65	31	25
8	2.8	1	95	68	57	45	15	10
9	2.2	1.8	57	40	19	15	29	23
10	3	1.2	75	52	59	42	18	12
11	4	2	48	30	68	43	8	5
12	2.5	0.8	63	95	59	27	22	18
13	7.7	2.6	10	8	15	27	30	24
14	0.8	0.3	12	9	12	20	22	10
15	3.8	3	98	90	35	45	12	11
16	3.5	2	33	48	39	52	38	32
17	3	2.7	30	40	43	50	9	9
18	2.2	2	27	55	22	20	48	27
19	1	1.2	101	75	60	60	24	17
20	5	2.1	14	13	69	55	33	25
21	6	2	54	80	50	42	30	19
<b>Mean</b>	<b>4.3</b>	<b>2.0</b>	<b>48.4</b>	<b>49.2</b>	<b>45.5</b>	<b>41.1</b>	<b>27.0</b>	<b>19.6</b>
<b>SD</b>	<b>2.0</b>	<b>0.6</b>	<b>28.3</b>	<b>28.4</b>	<b>16.6</b>	<b>16.7</b>	<b>10.8</b>	<b>8.3</b>

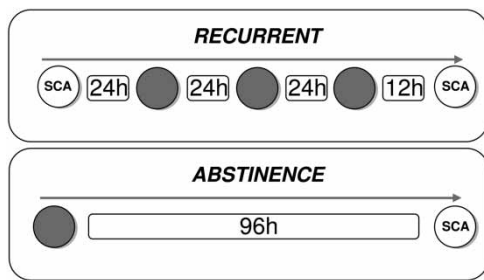


Figure 1. Flow chart diagram showing the differences in inter-ejaculation periods in recurrent and abstinence experiments. White circles labeled with SCA (sperm characteristics assessment) indicate the sperm samples which were used for SCA.

centrifugation and used for ICSI, results in an improved pregnancy rate when compared to patients undergoing abstinence for 4 days. Given this improvement we recommend this simple protocol be carried out as a routine procedure prior to sperm selection and fertilization (Fig. 1).

In using ICSI, a marked decrease in seminal volume between ABS and REC ejaculates presents no practical disadvantage. Additionally, no significant differences were observed in sperm motility or sperm concentration, but again these parameters do not compromise the selection of suitable spermatozoa for ICSI. Given this information, it is clear that the main factor explaining the improvement in pregnancy rate of this study is likely attributable to a reduction in sperm DNA damage. Our data is therefore further evidence of the importance of sperm DNA fragmentation for predicting and/or improving pregnancy, not only for humans [Evenson et al. 1999; Zini and Libman 2006; Bungum 2012] but also in other animal models [Kumar et al. 2013].

In general, sperm selection using density gradient centrifugation or swim-up techniques is associated with a decrease in the levels of sperm DNA damage [Zini et al. 2000; Gosálvez et al. 2010; Enciso et al. 2011]; some studies have also shown the benefit of using selected spermatozoa to improve pregnancy [Ng et al. 1992; Tanpaichitr et al. 1988]. This technical practice no doubt increases the probability of selecting a sperm free of DNA damage prior to ICSI. However, it should also be noted that while the incidence of SDF in the selected population may be reduced after these procedures, there is still a reasonable chance of accidentally selecting a single spermatozoa containing non-reparable DNA damage that was not previously excluded in the selection procedure. In fact, in some cases, the level of SDF may even increase in the selected sample when compared to the level of SDF in the neat sperm sample [Gosálvez et al. 2010; Santiso et al. 2010]. We must therefore consider that the possibility exists that while sperm selection prior to ICSI is efficient at removing DNA damaged spermatozoa, it probably does not remove sufficient spermatozoa harboring apparently sub-lethal DNA damage to increase reproductive outcome.

In our study we have provided evidence that REC in association with sperm density gradient centrifugation may be acting in a synergistic manner to reduce SDF to

produce a better sperm sample for use with ICSI. It is important to stress that the net effect for pregnancy under our experimental conditions was achieved after recurrent ejaculation combined with sperm selection plus ICSI. Probably with natural intercourse or intrauterine artificial insemination, the effect of ABS on pregnancy rate would be less, or non-existent. As previously reported by De Jonge et al. [2004], frequent ejaculation increases the percentage of sperm with immature chromatin within 1 day of ejaculation; similarly, Ollero et al. [2001] has demonstrated that most sperm with DNA damage are low density immature spermatozoa that possess residual cytoplasm (cytoplasmic droplets) around the midpiece and which are therefore isolated in the low density layers of the density gradient centrifugation. One possible explanation for the high recovery of sperm with intact DNA in our study is that recurrent ejaculation has resulted in a shift to a more immature population. Nevertheless, this population also contains a proportion, albeit smaller, of mature damaged and non-damaged sperm DNA. Following density gradient centrifugation, the immature spermatozoa (good and bad in terms of DNA quality) are removed, so that the resultant pellet is likely to contain a higher proportion of mature sperm with intact DNA; this then represents a synergistic benefit associated with innate physiology of sperm maturation and the centrifugal properties of the immature sperm cell. In addition and more obviously, recurrent ejaculation reduces the incidence of 'old' or degenerating spermatozoa in the cauda epididymidis and the subsequent accompanying negative effects of possible oxidative stress associated with sperm storage. This could be one of the reasons why we are obtaining larger differences in SDF reduction after ABS combined with sperm selection, than when neat and ABS samples without sperm selection are compared [Gosálvez et al. 2011]. Additionally, we must bear in mind that the levels of sperm DNA damage are lower in sperm samples recruited from immature testicular sperm tissues than those detected in ejaculated spermatozoa [Greco et al. 2005; Meseguer et al. 2009]. We do not discard that this fact is also contributing to a partial reduction in the level of sperm containing damaged DNA due to sperm passage acceleration through the epididymis when REC is practiced. While not tested in this experiment, because the system could be very stressful for patients, more intense recurrent ejaculation may produce even greater reduction in the incidence of sperm DNA fragmentation. For example, Gosálvez et al. [2011] has shown that ejaculations three hours apart can result in a massive reduction of SDF by as much as 50% when the first ejaculation is compared with the second ejaculation after sperm selection using a standard gradient centrifugation protocol.

While we are cautious about the use of recurrent ejaculation as a strategy that can be universally applied across all patients to decrease the level of sperm DNA damage, it is nonetheless a simple non-invasive approach that may have synergistic effects with other strategies conducted to decrease the level of sperm DNA fragmentation for ART. From the present experiments, we observed only two major limitations

to the use of REC: by men suffering from severe oligozoospermia and by males that experience problems physically performing recurrent erections/ejaculations. We conclude that recurrent ejaculation every 24 hours for four days with a final abstinence of 12 hours, combined with sperm selection using density gradient centrifugation, produces a significant increase in pregnancy rate when using ICSI. As ICSI was the strategy selected for fertilization, we propose that the observed reduction in SDF was the primary factor leading to improved reproductive outcome.

## Materials and Methods

This work compares the effects of ABS versus REC on sperm characteristics and involved two sets of patients, an experimental group of 40 couples and a control group of 150 couples; the final rate of pregnancy was compared between these groups. This study was randomized and the criteria to be included in each cohort were: 1) fertilization using ICSI with non-severe male factor and 2) ovodonation with non-severe male factor. Azoospermic, oligospermic, and astenospermic with less than 10% of a + b sperm motility were excluded from this study. All patients in this study consented to their participation according to Spanish legislation and confidentiality and following adherence to Spanish government ethical standards and the internal ethics committee of the clinic (GINEM/RES-01/2010).

### Experimental design

The experimental group included 40 males of couples that initially were able to complete an ABS period. The final structure of this cohort consisted of 30 ICSI with no severe male factor and 10 couples participating in ovodonation. The 40 couples in the experimental group proceeded to conduct recurrent ejaculation consisting of one ejaculation each day for 4 d and a 12 h abstinence before the final ejaculation. The final ejaculation was used for analysis of sperm characteristics and represented the seminal characteristics of the patient at the time of fertilization. The sperm characteristics considered in this experiment included volume, sperm concentration, sperm motility, and SDF and they were assessed as depicted in the flow chart diagram (Fig. 1 upper panel for REC and lower panel for ABS in the same patients). Sperm characteristics assessment (SCA) is denoted with open circles in Figure 1. Sperm concentration and motility were assessed with a CASA system (Microptic, Barcelona, Spain) and the sperm DNA fragmentation (SDF) was evaluated with Halosperm (Halotech, SL, Madrid, Spain) on recently ejaculated neat semen samples. For sperm selection prior to ICSI, a density gradient centrifugation using a 80/40 sperm filter gradient (Cryos International, Aarhus, Denmark) was used. Samples were centrifuged at 300g for 20 min and the different fractions aspirated, re-suspended in 2 mL of Sperm Wash medium (Cryos International, Aarhus, Denmark). From the experimental group only 21 patients were able to undergo seminal analysis of all the ejaculations in the protocols in order to compare the sperm values before and after ABS.

However, all 40 males from each couple completed the required ejaculatory schedule in order to produce the final (recurrent semen sample) used for ICSI. All these sperm samples were used for ICSI and the final results of pregnancy from this group (30 couples with ICSI and 10 with ICSI plus ovodonation and ICSI) were determined by fetal heart beat measured by ultrasound 5 weeks after embryo transfer. A control group of 150 couples was assessed as a comparison with the experimental group for pregnancy rate using the same proportion of cases (115 ICSI and 35 ovodonation and ICSI) as that produced in the experimental group. The males of the couples in this group engaged in abstinence from 3-4 d prior to ejaculation. This group was generated using all the cycles performed at the clinic during 2011.

For statistical analysis, SPSS v.15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was employed. Wilcoxon signed-rank tests for a non-parametric analysis were used to compare two related samples and Spearman Rho for correlation analysis. Observed frequencies of pregnancy in the different experimental conditions were compared using a chi-square incorporating Yates' correction.

## Acknowledgments

The authors thank Prof. Godfrey M. Hewitt and Steve Johnston for critical reading of the manuscript.

**Declaration of interest:** This work was partially supported by a grant (BFU2010-16738) from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (MCYT). The authors report no conflicts of interest.

**Author contributions:** Conceived and designed the experiments: PS-M, FS-M; Performed the experiments: PS-M, FS-M, MG-M; Analyzed the data: JG; Wrote the manuscript: JG, PS-M.

## References

- Antinori, M., Licata, E., Dani, G., Cerusico, F., Versaci, C., d'Angelo, D. et al. (2008) Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* **16**:835–841.
- Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosovsky, A., Yagoda, A., Lederman, H. et al. (2003) Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* **80**:1413–1419.
- Bungum, M. (2012) Sperm DNA integrity assessment: A new tool in diagnosis and treatment of fertility. *Obstet Gynecol Int* **2012**: doi:10.1155/2012/531042, 6 pages.
- De Jonge, C., La Fromboise, M., Bosmans, E., Ombet, W., Cox, A. and Nijs, M. (2004) Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril* **82**:57–65.
- Enciso, M., Iglesias, M., Galán, I., Sarasa, J., Gosálvez, A. and Gosálvez, J. (2011) The ability of sperm selection techniques to remove single- or double-strand DNA damage. *Asian J Androl* **13**:764–768.
- Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K. et al. (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* **14**:1039–1049.

- Gosálvez, J., González-Martínez, M., López-Fernández, C., Fernández, J.L. and Sánchez-Martín, P. (2011) Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril* **96**:1083–1086.
- Gosálvez, J., de la Torre, J., López-Fernández, C., Pérez-Gutiérrez, L., Ortega, L., Caballero, P. et al. (2010) DNA fragmentation dynamics in fresh versus frozen thawed 1 plus gradient-isolated human spermatozoa. *Sys Biol Rep Med* **56**: 27–36.
- Goudakou, M., Kalogeraki, A., Matalliotakis, I., Panagiotidis, Y., Gullo, G. and Prapas, Y. (2012) Cryptic sperm defects may be the cause for total fertilization failure in oocyte donor cycles. *Reprod Biomed Online* **24**:148–152.
- Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S. et al. (2005) Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* **20**:226–230.
- Huszar, G., Ozenci, C.C., Cayli, S., Zavaczki, Z., Hansch, E. and Vigue, L. (2003) Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosome status. *Fertil Steril* **79**:1616–1624.
- Kumar, D., Upadhyay, D., Salian, S.R., Rao, S.B., Kalthur, G., Kumar, P. et al. (2013) The extent of paternal sperm DNA damage influences early post-natal survival of first generation mouse offspring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **166**:164–167.
- Levitas, E., Lunenfeld, E., Weiss, N., Friger, M., Har-Vardi, I., Koifman, A. et al. (2005) Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. *Fertil Steril* **83**:1680–1686.
- Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., Gil-Salom, M., Remohí, J. and Fernandez, J.L. (2009) Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* **92**:1638–1645.
- Ng, F.L., Liu, D.Y. and Baker, H.W. (1992) Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod* **7**:261–266.
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Agarwal, A., Larson, K. et al. (2001) Characterization of subset of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* **16**:1912–1921.
- Said, T.M., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Glander, H.J. and Paasch, U. (2006) Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online* **13**:336–339.
- Salian, R.S., Kalthur, G., Uppangala, S., Kumar, P. and Adiga, S.K. (2012) Frozen-thawed spermatozoa from oligozoospermic ejaculates are susceptible to in situ DNA fragmentation in PVP-based sperm immobilization medium. *Fertil Steril* **98**:321–325.
- Santiso, R., Tamayo, M., Gosálvez, J., Meseguer, M., Garrido, N. and Fernández, J.L. (2010) Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length. *Mut Res* **688**:88–90.
- Tampaichitr, N., Agulnik, A., Seibel, M. and Taymor, M. (1988) Comparison of the in vitro fertilization rate by human sperm capacitated by multiple-tube swim-up and Percoll gradient centrifugation. *J In Vitro Fert Embryo Transf* **5**:119–122.
- Zini, A., Finellia, A., Phanga, D. and Jarvia, K. (2000) Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* **56**:1081–1084.
- Zini, A. and Libman, J. (2006) Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* **175**:495–500.

## Seminal quality in the first fraction of ejaculate

María Hebles, Monica Dorado, Miguel Gallardo, Mercedes González-Martínez & Pacual Sánchez-Martín

To cite this article: María Hebles, Monica Dorado, Miguel Gallardo, Mercedes González-Martínez & Pacual Sánchez-Martín (2015) Seminal quality in the first fraction of ejaculate, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61:2, 113-116, DOI: [10.3109/19396368.2014.999390](https://doi.org/10.3109/19396368.2014.999390)

To link to this article: <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.999390>



Published online: 30 Dec 2014.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 557



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

APPLICATION NOTES

## Seminal quality in the first fraction of ejaculate

María Hebles<sup>1\*</sup>, Monica Dorado<sup>2</sup>, Miguel Gallardo<sup>2</sup>, Mercedes González-Martínez<sup>2</sup>, and Pacual Sánchez-Martín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Clínica Ginemed and* <sup>2</sup>*Fundación Ginemed, c/Farmacéutico Murillo Herrera, Sevilla, Spain*

### Abstract

Semen samples from 40 patients were collected in consecutive fractions. The variability in semen quality of each fraction was then determined. The first ejaculated fraction (FEF) primarily contained prostatic secretions, while the second ejaculate fraction (SEF) held the majority of the spermatozoa suspended in the secretions from the seminal vesicle. Differences in sperm quality were observed when the FEF was compared to the SEF and the total ejaculate fraction (TEF). These included the seminal parameters (volume, sperm concentration, motility) and sperm DNA fragmentation (SDF). When compared to TEF and SEF, the FEF presented a lower volume, higher sperm concentration, higher motility rates, and lower SDF. The data suggest that the first fraction renders an improved subpopulation of spermatozoa, with lower SDF. Spermatozoa from this fraction and hence their use for ART may have a positive effect on fertilization and embryo development.

**Abbreviations:** FEF: first ejaculate fraction; SEF: second ejaculate fraction; TEF: total ejaculate fraction; SDF: sperm DNA fragmentation

### Keywords

Ejaculate, fraction, improvement, seminal parameters, sperm DNA fragmentation

### History

Received 7 August 2014  
Revised 27 November 2014  
Accepted 29 November 2014  
Published online 30 December 2014

### Introduction

The success of an assisted reproduction treatment is the sum of many variables, gamete quality being a very important. The assessment of the male factor and its influence on the results has been based on seminal parameters. It is understood that these parameters do not provide sufficient information to determine the fertilization ability of the sperm population, whether it is to be used for ICSI, IVF, or intrauterine insemination [Ahmadi and Ng 1999]. In comparison, the integrity of sperm DNA is correlated with infertility [Kumar et al. 2013; Ribas-Maynou et al. 2012] and has a direct impact on embryo quality and its development [Larrson-Cook et al. 2003; Virro et al. 2004]. Spermatozoal DNA is subject to damage by endogenous and exogenous factors, acquired as post-testicular damage during sperm transport through the epididymis [Ollero et al. 2001; Sakkas and Alvarez 2010] or iatrogenic damage, caused by the sample handling in the laboratory.

The ejaculate is comprised of several phases including the pre-ejaculatory phase, first ejaculated fraction (FEF), and second ejaculated fraction (SEF). The pre-ejaculatory phase, does not contain sperm, arises from the Cowper and Littre's glands to minimize urethral acidity. The FEF represents between 15 to 45% of the whole ejaculate. This phase is rich

in sperm and contains epididymal and prostatic secretions. The first fraction is rich in acid phosphatase, citric acid, magnesium, and zinc [Arver 1982; Mortimer 1994], and seems to exert a protective effect on the sperm. In comparison, the SEF, constitutes the remaining 55 to 85% of the whole volume. It exhibits a low sperm count and primarily contains secretions from the seminal vesicles [Arver 1982; Mortimer 1984]. The seminal plasma can be a source of reactive oxygen species, which could have a negative impact on sperm DNA integrity [Tremellen 2008] as demonstrated by others [Gosálvez et al. 2013; Kumar et al. 2011].

It has been previously demonstrated that simple and non-invasive strategies such as recurrent ejaculations are effective in increasing the quality of a semen sample which is to be used for ICSI, even increasing the probability of a successful reproductive outcome [Sánchez-Martín et al. 2013]. In this study, we have investigated the utility of using separate ejaculate fractions to improve semen sample quality for use in ART. We hypothesized that of the different phases contained in the ejaculate, the FEF would contain the sperm with the best semen parameters and provide a useful method of sperm selection prior to fertilization.

### Results and Discussion

#### Seminal parameters and DNA fragmentation

Sperm parameters, including volume, concentration, and motility, were analyzed in the different ejaculate fractions (FEF, SEF) and the total ejaculate fraction (TEF) of the three study subgroups, normozoospermic, oligozoospermic, and

\*Address correspondence to María Hebles Duvison, Clínica Ginemed, C/ Farmacéutico Murillo Herrera, n3, 41010, Sevilla, Spain. Tel: 0034954991193. E-mail: mhebles@ginemed.es

asthenozoospermic patients. As summarized in Table 1, the volume was significantly different between both FEF to SEF and FEF to TEF in all of the study groups. The differences in sperm concentration, however, failed to achieve significance ( $p > 0.05$ ) when FEF and TEF were compared. However, we did observe a significant increase in sperm concentration, in both normozoospermic and asthenozoospermic patients, respectively, when the FEF and SEF were compared. Similar results were observed in sperm motility, with significant differences between the FEF and the SEF in the three study groups. However, no significant differences were observed between FEF and TEF (Table 1).

The percentage of sperm with compromised DNA integrity as measured by the sperm chromatin dispersion test was significantly reduced in the first fraction of ejaculate of normozoospermic patients (16.8%) when compared with the second ejaculate fraction (30.3%,  $p = 0.024$ ) and total ejaculate (23.5%,  $p = 0.048$ ) (Figure 1). In oligozoospermic patients, there was also a marked increase in SDF from the FEF (22.2%) to the SEF (27.9%,  $p = 0.043$ ) and the TEF (25.4%,  $p = 0.263$ ). In asthenozoospermic patients, we found the same results with FEF fragmentation levels (21.2%) less than those found in SEF (37.4%,  $p = 0.002$ ) and TEF (29.54%,  $p = 0.414$ ).

The main objective of this study was to assess differences in sperm quality when performing semen sample collection in two fractions, the first being the initial pulse of ejaculate, and the second, the rest of the ejaculate. Our results showed increased sperm motility, sperm concentration, and reduced DNA fragmentation in the first fraction of the ejaculate as compared to the SEF and, consequently, the complete ejaculate as observed by others [Kumar et al. 2011].

The differences observed in the characteristics of the sperm populations in the two ejaculate fractions reflects differences in their composition [Eggert-Kruse et al. 2002; Fuse et al. 1999; Henkel et al. 1999; Wong et al. 2001]. For example, prostate secretions like prostate specific antigen (PSA) correlate positively with sperm motility yet have a degradative effect on seminogelins [Lilja et al. 1989;

Robert and Gagnon 1996]. Elements like zinc must also be considered as they are essential for the activation of sorbitol dehydrogenase and lactate dehydrogenase required for sperm motility [[Dhanad et al. 1981; Eliasson and Virginia 1985].

The ejaculate is treated as a whole even though it is well known that it is composed of many fractions [Kareskoski et al. 2011]. In regard to the differences observed in sperm DNA fragmentation, we must consider sources of DNA damage. In addition to the basal damage that occurs during spermiogenesis, e.g., histone replacement, laboratory introduced iatrogenic damage must be considered. Prolonged contact of spermatozoa with seminal vesicle secretions which have chelating agents, alkaline pH, and low zinc availability can affect chromatin stability and hence DNA fragmentation [Arver 1982; Mortimer 1984]. To lessen iatrogenic damage, the time between semen delivery and processing should be minimized. As suggested by Kumar et al. [2011] fractionated ejaculate collection is another means of reducing iatrogenic damage. The sperm from the first ejaculate fraction contains prostatic secretions rich in acid phosphatase, magnesium, and zinc, promoting the formation of disulfide bridges, preventing premature chromatin decondensation and inhibiting endonuclease activity [Arver 1982]. By collecting the whole ejaculate together, the sperm are exposed to prolonged contact between the components of the first fraction of the ejaculate and the second fraction, with a deleterious result. In comparison, fractionated collection is a simple method that renders a better population of sperm characterized by increased sperm motility, concentration, and most importantly, decreased DNA fragmentation. Whether the separate collection of the FEF and its use influences syngamy, embryo development, and implantation remains to be critically evaluated.

## Materials and Methods

### Patient selection criteria

From February 2013 to May 2013 we included a total of 40 IVF patients who consulted Ginemed Reproduction Clinic.

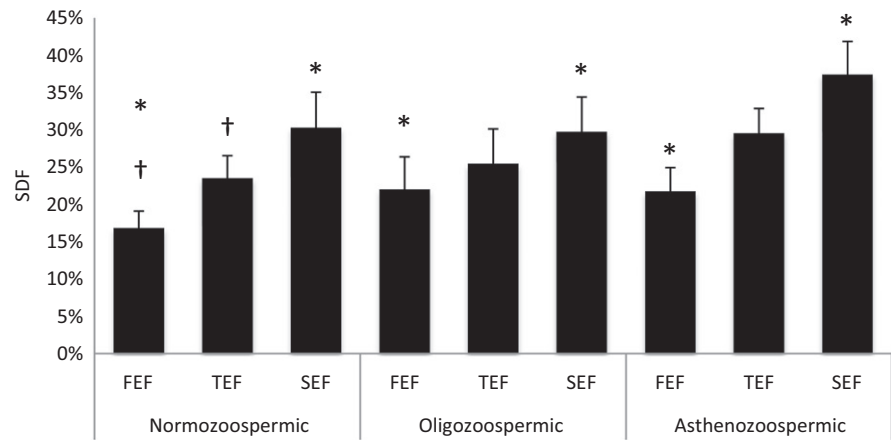
Table 1. Seminal parameters.

Group	FEF	SEF	<i>p</i>	TEF	<i>P</i>
Volume (mL)					
Normozoospermic ( <i>n</i> = 10)	0.63 (±0.08)	1.38 (±0.28)	<b>0.037</b>	1.86 (±0.21)	<b>0.000</b>
Oligozoospermic ( <i>n</i> = 13)	0.68 (±0.10)	1.33 (±0.23)	<b>0.009</b>	2.11 (±0.25)	<b>0.000</b>
Asthenozoospermic ( <i>n</i> = 27)	0.65 (±0.08)	1.53 (±0.20)	<b>0.000</b>	2.21 (±0.17)	<b>0.001</b>
Concentration ( $1 \times 10^6$ /mL)					
Normozoospermic ( <i>n</i> = 10)	106.52 (±16.5)	45.82 (±6.42)	<b>0.002</b>	79 (±9.47)	0.069
Oligozoospermic ( <i>n</i> = 13)	20.96 (±4.48)	6.25 (±0.72)	<b>0.001</b>	12.92 (±1.32)	0.098
Asthenozoospermic ( <i>n</i> = 27)	71.91 (±15.76)	28.72 (±12.29)	<b>0.006</b>	59 (±9.70)	0.370
Motility (%a+b)					
Normozoospermic ( <i>n</i> = 10)	63.32 (±5.65)	48.34 (±2.45)	<b>0.011</b>	57.24 (±2.24)	0.149
Oligozoospermic ( <i>n</i> = 13)	43.29 (±5.36)	27.57 (±4.27)	<b>0.034</b>	33.69 (±4.49)	0.186
Asthenozoospermic ( <i>n</i> = 27)	39.41 (±2.94)	23.22 (±2.99)	<b>0.005</b>	29.73 (±2.09)	0.710

Differences (mean ± SEM) between the seminal parameters: volume (mL), motility (% of a+b forms), concentration (spermatozoax  $10^6$ /mL). Observed in first ejaculate fraction (FEF), second ejaculate fraction (SEF), and total ejaculate fraction (TEF) in normozoospermic, oligozoospermic, and asthenozoospermic patients; *p*: statistical significance level between FEF and SEF; *P*: statistical significance level between FEF and TEF.



Figure 1. Sperm DNA fragmentation. The levels of sperm DNA fragmentation (SDF) were measured by the sperm chromatin decondensation (SCD) assay. The first ejaculate fraction (FEF), total ejaculate fraction (TEF), and second ejaculate fraction (SEF), in normozoospermic, oligozoospermic, and asthenozoospermic patients were compared. SDF presents a similar distribution in all groups, with lower levels in FEF as compared to both SEF and TEF. † $p < 0.05$ ; \* $p < 0.05$ .



We established three study subgroups, with patients who were diagnosed as normozoospermic ( $n = 10$ ), oligozoospermic ( $n = 13$ ), and asthenozoospermic ( $n = 27$ ). For patient classification we followed WHO [1999] criteria which defines oligozoospermia as a sperm concentration  $< 20 \times 10^6/\text{mL}$  and asthenozoospermia as motility  $< 50\%$  (a+b). Patients whose semen sample presented both oligo and asthenozoospermic parameters were included in both groups. All patients included were thoroughly informed of the study and written consent was obtained from all the participants before inclusion. The Institutional Ethical Committee approved the study.

### Split ejaculate collection

Semen was collected by masturbation into two containers labelled as fraction 1 and fraction 2. Patients were instructed to collect in container 1 the first two organic contractions, which constitute the FEF, and all the subsequent contractions in container 2, corresponding to the SEF. Previously, patients included in the study were instructed on how to perform the fractionated collection of the ejaculate protocol. After collection of the sample according to the protocol, the TEF was reconstituted from proportional aliquots from both fractions. From there, we proceeded to the analysis of the 3 fractions. Patients maintained an ejaculatory abstinence period between 2 and 5 days.

### Semen analysis

Sperm count, motility, and morphology were assessed in liquified semen according to WHO [1999] criteria. Normal values for semen variables were sperm concentration  $> 20$  million/mL, sperm motility  $> 50\%$  (a+b), and normal morphology  $> 30\%$ . A single observer evaluated all the samples to avoid inter-observer variation in the study. Volume was determined with a 10 mL serological pipette; sperm concentration and motility were assessed in a Makler chamber. SDF was assessed using sperm chromatin dispersion technique by Halosperm (Halotech DNA, Madrid, Spain), following the protocol recommended by the manufacturer. Staining was performed with diff quik and counting was carried out in a bright field microscope under oil immersion at  $100 \times$  magnification. A total of 500 spermatozoa were counted in each sample. Sperm with a large or medium halo (halo diameter  $> 1/3$  of sperm head size) were considered negative for

fragmentation meanwhile sperm with a small or no halo (halo diameter  $< 1/3$  of sperm head size) and degraded sperm were considered positive for DNA fragmentation.

### Statistical analysis

The data is presented as mean and standard error (mean  $\pm$  SEM) of the values. The distribution of the samples was checked using the Shapiro-Wilk test of normality. The statistical significance level was calculated with the Student's  $t$  Test for the normally distributed variable (motility) and the nonparametric Mann-Whitney test for those which did not follow a normal distribution, using the software SPSS XVI (SPSS Inc. Released 2007, SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, IL, USA). The graphs were plotted using Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Excel Computer Software, Microsoft, 2003, Redmond, WA, USA).

### Acknowledgments

We would like to thank Mrs. Stephanie Blake for her help in translating the manuscript, and all of the staff of Ginemed Clinics for their help in conducting the study.

### Declaration of interest

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

### Authors contributions

Conceived and designed the experiments, and took part in the writing of the manuscript: MH; Performed the statistical analysis of the data and took part in the writing of the manuscript: MD; Performed the experiments and took part in the writing of the manuscript: MGal; Performed the experiments: MGon; Conceived and designed the experiments, and revised the manuscript before submission: PS-M.

### References

- Ahmadi, A. and Ng, S.C. (1999) Development capacity of damaged spermatozoa. *Human Reprod* **14**:2279–2285.
- Arver, S. (1982) Zinc and zinc ligands in human seminal plasma III. The principal low molecular weight zinc ligand in prostatic secretion and plasma seminal. *Acta Physiol Scand* **116**:67–73.
- Dhanad, O.P., Rao, B.R. and Razdan, M.N. (1981) Sorbitol dehydrogenase and hyaluronidase activity in buffalo semen. *Ind J Exp Biol* **19**: 286–289.

- Eggert-Kruse, W., Zwick, E.M., Batschulat, K., Rohr, G., Armbruster, P.E., Petzoldt, D., et al. (2002) Are zinc levels in seminal plasma associated with seminal leucocytes and other determinants of semen quality? *Fertil Steril* **77**:260–269.
- Eliasson, R. and Virji, N. (1985) LDH-C4 in human seminal plasma and its relationship to testicular function. *Int J Androl* **8**:201–203.
- Fuse, H., Kazama, T., Ohta, S. and Fujiuchi, Y. (1999) Relationship between zinc concentrations in seminal plasma and various sperm parameters. *Int Urol Nephrol* **31**:401–408.
- Gosálvez, J., Caballero, P., López-Fernández, C., Ortega, L., Guijarro, J.A., Fernández, J.L., et al. (2013) Can DNA fragmentation of neat or swim-up spermatozoa be used to predict pregnancy following ICIS of fertile oocyte donors? *Asian J Androl* **15**:821–818.
- Henkel, R., Bittner, J., Weber, R., Huther, F. and Miska, W. (1999) Revelance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertil Steril* **71**:1138–1143.
- Kareskoski, M., Sankari, S., Johannisson, A., Kindahl, H., Andersson, M. and Katila, T. (2011) The association of the presence of seminal plasma and its components with sperm longevity in fractionated stallion ejaculates. *Reprod Domest Anim* **46**:1073–1081.
- Kumar, D., Kalthur, G., Mascarenhas, C., Kumar, P. and Adiga S.K. (2011) Ejaculate fractions of asthenozoospermic and teratozoospermic patients have differences in the sperm DNA integrity. *Andrologia* **43**:416–421.
- Kumar, M., Kumar, K., Jain, S., Hassan, T. and Dada, N. (2013) Insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo. *Clinics (Sao Paulo)* **68**:5–14.
- Larson-Cook, K.L., Brannian, J.D., Hansen, K.A., Kasperson, K.M., Aamold, E.T. and Evenson, D.P. (2003) Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* **80**:895–902.
- Lilja, H., Abrahamsson, P.A. and Lundwall, A. (1989) Semenogelin, the predominant protein in human semen. Primary structure and identification of closely related proteins in the male accessory sex glands and on the spermatozoa. *J Biol Chem* **264**:1894–1900.
- Mortimer, D. (1994) Biochemistry of spermatozoa and seminal plasma. In: *Practical Laboratory Andrology*, Oxford University Press, New York, USA, pp 89–109.
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Agarwal, A., Larson, K., et al (2001) Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reprod* **16**:1912–1921.
- Ribas-Maynou, J., Garcia-Peiró, A., Fernandez-Encinas, A., Amengual, M.J., Prada, E., Cortes, P., et al. (2012) Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* **7**: e44679.
- Robert, M. and Gagnon, C. (1996) Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. *Biol Reprod* **55**:813–821.
- Sakkas, D. and Alvarez, J.G. (2010) Sperm DNA fragmentation: mechanism of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* **93**:1027–1036.
- Sánchez-Martín, P., Sánchez-Martín, F., González-Martínez, M. and Gosálvez, J. (2013) Increased pregnancy after reduced male abstinence. *Syst Biol Reprod Med* **59**:256–260.
- Tremellen, K. (2008) Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum Reprod Update* **14**:243–258.
- Virro, M.R., Larson-Cook, K.L., and Evenson, D.P. (2004) Sperm chromatin structure assay (SCSA<sup>®</sup>) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* **81**:1289–1295.
- Wong, W.Y., Flik, G., Groenen, P.M., Swinkels, D.W., Thomas, C.M., Copius-Peereboom, J.H., et al. (2001) The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol* **15**:131–136.
- World Health Organization (1999) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen – Cervical Mucus Interaction*. 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge.

# Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm

Sandro C. Esteves, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> Fernando Sánchez-Martín, M.D.,<sup>b</sup> Pascual Sánchez-Martín, M.D.,<sup>b</sup> Danielle T. Schneider, M.Sc.,<sup>a</sup> and Jaime Gosálvez, Ph.D.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Androfert, Andrology and Human Reproduction Clinic, Campinas, Brazil; <sup>b</sup> Ginemed, Seville, Spain; and <sup>c</sup> Unit of Genetics, Department of Biology, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

**Objective:** To investigate the effectiveness of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using testicular sperm as a strategy to overcome infertility in men with high sperm DNA fragmentation (SDF).

**Design:** Prospective, observational, cohort study.

**Setting:** Private IVF centers.

**Patient(s):** A total of 147 couples undergoing IVF-ICSI and day 3 fresh ETs whose male partner has oligozoospermia and high SDF.

**Intervention(s):** Sperm injections were carried out with ejaculated sperm (EJA-ICSI) or testicular sperm (TESTI-ICSI) retrieved by either testicular sperm extraction (TESE) or testicular sperm aspiration (TESA). SDF levels were reassessed on the day of oocyte retrieval in both ejaculated and testicular specimens.

**Main Outcome Measure(s):** Percentage of testicular and ejaculated spermatozoa containing fragmented DNA (%DFI) and clinical pregnancy, miscarriage, and live-birth rates.

**Result(s):** The %DFI in testicular sperm was 8.3%, compared with 40.7% in ejaculated sperm. For the TESTI-ICSI group versus the EJA-ICSI group, respectively, the clinical pregnancy rate was 51.9% and 40.2%, the miscarriage rate was 10.0% and 34.3%, and the live-birth rate was 46.7% and 26.4%.

**Conclusion(s):** ICSI outcomes were significantly better in the group of men who had testicular sperm used for ICSI compared with those with ejaculated sperm. SDF was significantly lower in testicular specimens compared with ejaculated counterparts. Our results suggest that TESTI-ICSI is an effective option to overcome infertility when applied to selected men with oligozoospermia and high ejaculated SDF levels. (*Fertil Steril*® 2015;104:1398–405. ©2015 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Ejaculation, infertility, male/therapy, intracytoplasmic sperm injection, sperm DNA fragmentation, sperm retrieval

**Discuss:** You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertstertforum.com/estevess-testi-icsi-high-sdf/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.\*

\* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

**S**perm DNA fragmentation (SDF) has emerged as an important biomarker for assessing male fertility potential (1, 2). SDF can result from intrinsic and extrinsic factors and has been associated with several

infertility phenotypes, including unexplained infertility, idiopathic infertility, repeated intrauterine insemination and IVF failure, and recurrent miscarriage (3, 4). Despite the controversy concerning the routine use of SDF testing in the clinical evaluation of male factor infertility, the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine has recently acknowledged that determining the values of SDF

Received June 13, 2015; revised August 8, 2015; accepted August 24, 2015; published online October 1, 2015.

S.C.E. has nothing to disclose. F.S.-M. has nothing to disclose. P.S.-M. has nothing to disclose. D.T.S. has nothing to disclose. J.G. has nothing to disclose.

Partially supported by Spanish Government research grant BFU2013-44990R and an institutional research fund from Androfert.

Reprint requests: Sandro C. Esteves, M.D., Ph.D., Director, Androfert, Avenida Dr. Heitor Pentead, 1464, 13075-460, Campinas, São Paulo, Brazil (E-mail: [s.esteves@androfert.com.br](mailto:s.esteves@androfert.com.br)).

*Fertility and Sterility*® Vol. 104, No. 6, December 2015 0015-0282/\$36.00  
Copyright ©2015 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.028>

may be clinically informative for IUI or IVF and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcomes (5).

A few noninvasive strategies have been proposed to alleviate SDF and/or select sperm with higher quality chromatin content for IVF and ICSI. The intake of oral antioxidants (6, 7), varicocele repair (8), and the use of recurrent ejaculations before fertilization (9, 10) alone or combined with micromanipulation-based sperm selection techniques such as magnetic cell sorting (11, 12), physiological ICSI (13), or intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (14–16) have been attempted with varying success rates to decrease SDF. Yet none of these interventions, alone or combined, have been unequivocally proven to be of clinical value to bypass the potential detrimental effect of abnormal SDF on assisted reproductive technology (ART) outcomes (5).

Spermatozoa retrieved from the testis of men with abnormal ejaculated sperm DNA integrity tend to have better DNA quality (17, 18). However, the synergistic combination of testicular sperm retrieval and ICSI in oligozoospermic men with high ejaculated SDF has been poorly studied. The present study aimed to investigate the effectiveness of ICSI using testicular sperm as a strategy to overcome infertility in men with oligozoospermia and high SDF.

## MATERIAL AND METHODS

A prospective, observational, cohort study was conducted between January 2011 and December 2013 in two private IVF centers in Spain and Brazil. The Institutional Review Board of the participating institutions approved the study, and informed consent was obtained from all participants.

### Patient Selection

The following inclusion criteria were established: [1] infertility duration > 1 year; [2] women and men ages 39 and 45 years old or less, respectively, undergoing IVF-ICSI; [3] idiopathic oligozoospermia (< 15 million/mL), with no obvious abnormalities noted in the medical history, physical examination, and endocrine profile; [4] persistent high SDF levels (> 30%) in two semen specimens after oral antioxidant treatment for a minimum of 3 months; and [5] no evidence of subclinical genital infections and/or leukocytospermia. Exclusion criteria included [1] severe male factor infertility (severe oligozoospermia, < 5 million/mL; and azoospermia); [2] women with history of poor response to ovarian stimulation, including those fitting the Bologna criteria for expected poor responders (19); [3] patients in whom oocyte or sperm donation was used as part of the treatment strategy; and [4] uterine pathology. Only the first ICSI-ET cycle of each patient using fresh sperm for injections was included in this analysis. Oral antioxidant therapy varied according to the prescribing physicians but included a combination of commercially available vitamins (C, E, and folic acid) and supplements (selenium and zinc).

### SDF Analysis

Samples were collected by masturbation after 2–3 days of ejaculatory abstinence. After liquefaction, specimens were assessed for volume, count, motility, vitality, morphology,

and leukocytes, in accordance with the fifth edition of the World Health Organization laboratory manual for the examination and processing of human semen (20). SDF was assessed using the sperm chromatin dispersion (SCD) test according to the protocol described by Fernández et al. (21). To avoid iatrogenic DNA damage, sperm specimens were assessed for DNA fragmentation 1 hour after ejaculation.

SDF was reassessed on the day of oocyte pick-up in both neat semen and testicular specimens. A variant of the Halosperm test (Halotech DNA) that combines a dual fluorescent cocktail probe to discriminate somatic cells from spermatozoa was used. This technique was described elsewhere to study a patient with Kartagener syndrome and recurrent implantation failure (22). Briefly, GelRed (Biotium) was used for DNA staining, and 2,7-dibrom-4-hydroxy-mercury-fluorescein (Sigma-Aldrich) for protein staining. Images were captured with a black and white cooled camera (Leica DCF 300) mounted onto an epifluorescence microscope (DMRB; Leica Microsystems) equipped with an appropriate single-band filter block for each fluorochrome (Semrock). A minimum of 200 spermatozoa per sample was scored. The spermatozoa with very small or no halos were defined as the cells containing fragmented DNA, and results were expressed as the percentage of sperm with DNA fragmentation (%DFI; DNA fragmentation index).

### Testicular Sperm Retrieval

Retrievals were performed by testicular sperm extraction (TESE) or testicular sperm aspiration (TESA), as described elsewhere (23). The choice between the two methods was based purely on surgeon preference. All procedures were carried out under local anesthesia combined with an IV bolus infusion of propofol on an outpatient basis (24). The extracted testicular tissue was flushed into a tube containing sperm medium. Subsequently, the seminiferous tubules were mechanically minced using fine needles attached to tuberculin syringes to ensure wall breakdown and cellular content loss (25, 26). Successful retrieval was defined as the presence of an adequate number of motile sperm for sperm injections.

### Study Protocol

Couples were subjected to IVF-ICSI using either ejaculated sperm collected after an abstinence period of 2–3 days (EJA-ICSI) or testicular sperm (TESTI-ICSI) retrieved by TESE or TESA. All sperm injections were performed with fresh specimens. Controlled ovarian stimulation was carried out with recombinant FSH (Gonal-f, Merck Serono), starting on day 2 or 3 after onset of menses, with doses ranging from 112.5 to 300 IU per day according to the patient age, ovarian reserve, and the current practice of attending physicians. A daily administration of GnRH antagonist (cetorelix 0.25 mg; Cetrotide, Merck Serono) for pituitary suppression was prescribed when the leading follicle achieved 13 mm. Recombinant hCG (rec-hCG 250 µg; Ovidrel; Merck Serono) was administered SC for final oocyte maturation when at least two follicles reached a mean diameter of 17 mm. All patients were subjected to transvaginal ultrasound-guided oocyte pick-up

36 hours after rec-hCG administration. The fertilized oocytes were cultured, and embryo quality was assessed. Abdominal ultrasound-guided ET on day 3 after oocyte pick-up was carried out, and all patients started luteal phase support with a single daily administration of vaginal P in gel (Crinone 8%, Merck Serono). Pregnant patients were followed using ultrasound scans, and P supplementation was maintained until the ninth gestational week.

## Outcomes

Clinical pregnancy was determined by the visualization of a gestational sac with an embryo showing cardiac activity on ultrasound at weeks 5–7. Miscarriage was defined as a nonviable clinical pregnancy noted on ultrasound follow-up until gestational week 20. Live-birth rate was defined as the ratio between the number of deliveries resulting in at least one live birth and the number of ETs. The main outcome measures were the percentage of testicular and ejaculated spermatozoa containing fragmented DNA (%DFI), clinical pregnancy rates, miscarriage rates, and live-birth rates.

## Statistical Analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SD or as percentages. A comparison of the quantitative variables was performed using the Mann-Whitney *U* test. For categorical data, the contingency Pearson  $\chi^2$  was used.  $P < .05$  was considered statistically significant. A multivariate logistic regression model was constructed for dichotomous outcomes. For pregnancy outcomes, the covariates included male and female age, duration of infertility, and number of transferred embryos. Since no other comparative study with similar characteristics was available, we estimated a sample size of 80 subjects per group for an expected difference of 30% in live-birth rates considering a 5% significance level and 80% power. Statistical analyses were performed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, ver. 11).

## RESULTS

### Patient Characteristics

During the study period, 635 couples whose male partner had %DFI  $>30\%$  were admitted to the ART programs of partici-

pating institutions. Of them, 172 fulfilled the inclusion criteria and agreed to participate. Treatment options were discussed with the patients to whom we offered the use of testicular sperm. Eighty-one patients accepted this option and made up the TESTI-ICSI group. The remaining 91 opted to undergo ICSI with ejaculated sperm (EJA-ICSI group). Patient characteristics are shown in Table 1. Groups were homogeneous regarding age, endocrine profiles, infertility duration, and proportion of females with an associated fertility problem.

### Testicular Sperm Retrieval

TESA was used in 52 cases and TESE in 29 cases. The sperm retrieval success rate with TESA or TESE was 100%. The overall complication rate after retrievals was 6.2% and did not differ between TESA and TESE methods. Pain was the most common complaint ( $n = 4$  patients), while two patients had moderate scrotal swelling after TESE.

### SDF

All semen specimens reassessed for SDF on the day of oocyte pick-up exhibited %DFI  $>30\%$ . The %DFI was compared between ejaculated and testicular sperm in the TESTI-ICSI group. As shown in Figure 1 (eSlide VM01016), spermatozoa were easily distinguished from somatic cells in testicular specimens. Spermatozoa exhibiting red fluorescence with a green flagellum and no halo of chromatin dispersion represented the cells with fragmented DNA (Fig. 1A, arrow cap). In contrast, spermatozoa exhibiting red fluorescence with a green flagellum and haloes of chromatin dispersion represented the cells with nonfragmented DNA (Fig. 1A, arrow). Using these criteria for sperm identification and classification, the %DFI in the semen were  $40.7\% \pm 9.9\%$  and  $40.9\% \pm 10.2\%$  in the TESTI-ICSI and EJA-ICSI groups, respectively (Mann-Whitney *U* test;  $P = .23$ ) and  $8.3\% \pm 5.3\%$  in testicular specimens of patients from the TESTI-ICSI group (Mann-Whitney *U* test;  $P < .001$ ).

### Sperm Injection Outcomes

There were no significant differences in the number and maturity of retrieved oocytes between the groups. The two-

**TABLE 1**

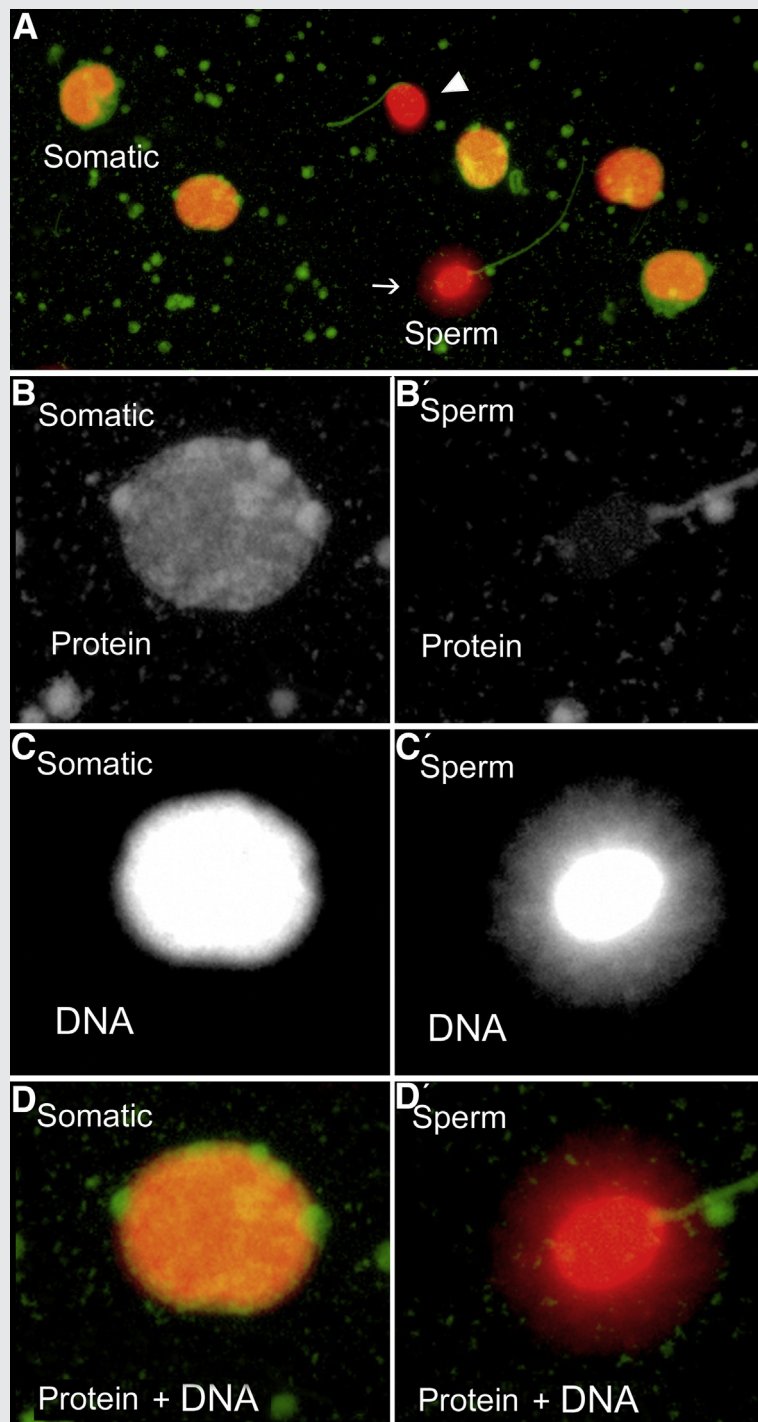
Clinical characteristics of the couples subjected to ICSI with testicular and ejaculated sperm.

Characteristic	TESTI-ICSI cycles (n = 81)	EJA-ICSI cycles (n = 91)	P value
Male age, y	37.3 $\pm$ 4.6	36.8 $\pm$ 3.1	.439
Female age, y	34.9 $\pm$ 4.5	33.4 $\pm$ 3.5	.133
Basal FSH levels, IU/L	6.2 $\pm$ 2.7	6.4 $\pm$ 1.8	.596
Infertility duration, y	6.3 $\pm$ 3.1	5.8 $\pm$ 2.2	.259
No. of days of stimulation	10.1 $\pm$ 1.3	9.9 $\pm$ 1.5	.389
Total gonadotropin dose, IU	2,250 $\pm$ 475	2,175 $\pm$ 625	.415
No. of oocytes			
Retrieved	12.0 $\pm$ 5.2	11.1 $\pm$ 4.8	.277
Metaphase II	9.3 $\pm$ 5.4	8.8 $\pm$ 4.7	.533
Two pronuclei fertilization rate (%)	56.1 $\pm$ 15.0	69.4 $\pm$ 17.0	.0001

Note: Data presented as mean  $\pm$  SD.

Esteves. TESTI-ICSI in men with high SDF. *Fertil Steril* 2015.

FIGURE 1



The SCD method for assessment of SDF in testicular sperm. A variant of the Halosperm test (Halotech DNA) that combines a dual fluorescent cocktail probe to discriminate somatic cells from spermatozoa was used. Spermatozoa and somatic cells exhibit differences in the wavelength emission associated with each fluorochrome (*green* for proteins and *red* for DNA). Spermatozoa exhibit only red fluorescence on the sperm head owing to protamine removal, while nonsperm cells fluoresce yellow as a result of the combined emission of both fluorochromes (A). Spermatozoa exhibiting red fluorescence with a green flagellum and no halo of chromatin dispersion represented those with fragmented DNA (*arrow cap*). In contrast, spermatozoa exhibiting red fluorescence with a green flagellum and haloes of chromatin dispersion represented those with nonfragmented DNA (*arrow*). A somatic cell with its typical high protein and DNA contents and a spermatozoon with its characteristic low protein remnant and high DNA content are seen in panels B and C, respectively, using a single channel fluorescence emission. After merging the information provided by protein and DNA selective staining, somatic cells and spermatozoa can be easily distinguished (D and D'). In addition, the sperm tail fluoresces in green, and this feature also helps to distinguish spermatozoa from other cell elements (A and D'). A high-resolution version of this slide for use with the Virtual Microscope is available as eSlide VM01016.

Esteves. TESTI-HCSI in men with high SDF. *Fertil Steril* 2015.

TABLE 2

## Clinical pregnancy, miscarriage, and live birth in TESTI-ICSI and EJA-ICSI cohorts.

Variable	TESTI-ICSI (n = 77) <sup>a</sup>	EJA-ICSI (n = 87) <sup>a</sup>	P value	Relative risk (95% CI)
Embryos				NA
Number, mean ± SD	7.0 ± 3.7	6.4 ± 3.7	.327	
High quality on day 3 (%), mean ± SD	45.2 ± 12.0	41.8 ± 14.1	.118	
No. transferred, mean ± SD	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.6	.206	
Clinical pregnancy, n (%)	40 (51.9)	35 (40.2)	.131	1.29 (0.92–1.80)
Miscarriage, n (%)	4 (10.0)	12 (34.3)	.012	0.29 (0.10–0.82)
Live birth, n (%)	36 (46.7)	23 (26.4)	.007	1.76 (1.15–2.70)

Note: NA = not applicable.

<sup>a</sup> Among the enrolled patients (see Table 1), a total of eight fresh transfers were cancelled, including four in the TESTI-ICSI group and four in the EJA-ICSI group.

Esteves. TESTI-ICSI in men with high SDF. *Fertil Steril* 2015.

pronuclear zygote rate was lower in the TESTI-ICSI group (56.1%) compared with in the EJA-ICSI group (69.4%;  $P=.0001$ ; Table 1). The quality embryos rate and the mean number of transferred embryos were similar between the groups (Table 2).

Pregnancy and miscarriage rates favored the TESTI-ICSI group (Table 2). The adjusted relative risk for miscarriage and live birth between the TESTI-ICSI and EJA-ICSI groups were 0.29 (95% confidence interval [CI], 0.10–0.82; Wald  $P=.019$ ) and 1.76 (95% CI, 1.15–2.70; Wald  $P=.008$ ). The number needed to treat by TESTI-ICSI compared with EJA-ICSI to obtain an additional live birth per fresh transfer cycles was 4.9 (95% CI, 2.8–16.8). A total of eight fresh transfers were cancelled, including four in the TESTI-ICSI group and four in the EJA-ICSI group. The reasons for cancellation were risk of ovarian hyperstimulation in six cases and no embryos available for transfers owing to arrested development in two cases. All embryos were vitrified in the first case.

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first prospective comparative study evaluating the use of testicular and ejaculated spermatozoa from oligozoospermic infertile men with high SDF on ICSI outcomes. The SDF index was approximately 5-fold lower in testicular sperm compared with in ejaculated sperm, and our results indicate that the use of testicular sperm was associated with improved ICSI outcomes in men with oligozoospermia and persistent elevated SDF. Given the markedly lower %DFI in testicular specimens compared with in ejaculated counterparts, the probability of selecting spermatozoa free of (or with reduced) DNA damage for ICSI will increase if testicular specimens are used. Fertilization of an oocyte by a genomically intact testicular spermatozoon will increase the chances of creating a normal embryonic genome that will ultimately increase the likelihood of pregnancy and live birth. The presence of nonfragmented paternal DNA may explain the observed better pregnancy outcomes with testicular sperm injections.

Our study depended primarily on testicular sperm retrieval, which yielded motile sperm for injections in all cases. We adopted the strict criterion of not including patients with severe oligozoospermia (<5 million/mL) because the presumably low number of retrieved spermatozoa

might compromise the SDF assessment in testicular sperm. Both TESA and TESE were effective methods for sperm extraction in our group of men with oligozoospermia and high ejaculated SDF. A small portion of testicular tissue was obtained either by needle aspiration or by open biopsy. Because all patients had patent canalicular systems, we used testicular rather than epididymal retrievals to avoid the risk of ductal obstruction. Moreover, it is our opinion that testicular retrievals should be preferred over epididymal retrievals based on the higher reported %DFI in epididymal sperm compared with in testicular sperm in men with obstructive azoospermia (27), even though these findings have not yet been confirmed in oligozoospermia. Although testicular retrievals are invasive procedures carrying the risk of complications such as hematoma and infection, no patient was affected in our series.

While it has been shown that the SDF measurement in consecutive ejaculates is associated with low biological variability (28), we included men with high SDF in at least two tests to avoid enrolling individuals with significant SDF variations. We also asked patients to abstain from ejaculation for a fixed period of 2–3 days before collection owing to the reported influence of the abstinence period on SDF test results (10). Moreover, all subjects had persistent high ejaculated SDF despite taking oral antioxidants. These agents have been shown to alleviate reactive oxygen species (ROS)-induced damage during sperm transport through the epididymis (29). ICSI rather than IVF was our chosen treatment method owing to the significantly higher pregnancy rates reported with ICSI in patients with high sperm DNA damage (30).

Prior to this study, Greco et al. were the first to describe the synergistic combination of testicular sperm retrieval and ICSI in infertile men with high SDF (17). In their study, a significantly higher pregnancy rate was obtained when sperm injections were carried out with testicular compared with ejaculated spermatozoa (44.4% vs. 6%;  $P<.05$ ). The data reported by Greco et al. suggest that infertile couples whose male partners have ejaculates with high SDF benefit from ICSI using testicular sperm. However, their findings should be interpreted with caution as they were based on a small group of 18 patients subjected to sequential ICSI attempts with ejaculated and testicular sperm. In another small study involving 17 patients with cryptozoospermia who failed to

conceive after repeated ICSI cycles using ejaculated sperm, Ben-Ami et al. showed that testicular sperm was associated with higher delivery rates compared with ejaculated sperm (27.5% vs. 9.4%;  $P=.028$ ), but SDF was not assessed in their study (31). Lastly, Weissman et al. showed that testicular spermatozoa was useful to overcome long-standing recurrent implantation failure in a group of four couples who failed to conceive by ICSI using ejaculated sperm (32).

A plausible reason for the improved ICSI outcomes in the aforementioned series might be the lower SDF levels in testicular specimens compared with ejaculated counterparts (17, 18). In the study by Greco et al., DFI assessed by terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay was significantly higher in ejaculated compared with testicular sperm ( $23.6\% \pm 5.1\%$  vs.  $4.8\% \pm 3.6\%$ ;  $P<.001$ ) (17). Using the same assay, Moskovtsev et al. studying a group of 12 men with high SDF found that the DFI was threefold higher in ejaculated sperm compared with testicular sperm ( $39.7\% \pm 14.8\%$  vs.  $13.3\% \pm 7.3\%$ ;  $P<.001$ ) (18). Interestingly, all testicular specimens but one in each study exhibited markedly lower %DFI than ejaculated counterparts. Our results are consistent with these observations as the %DFI measured by the SCD method was  $\leq 15\%$  in all testicular specimens with no exceptions. In contrast, %DFI was  $>30\%$  in all ejaculated specimens. Whereas DNA damage can be found in testicular sperm as a result of direct meiotic failure or early defective chromatin assembling at the spermatid stage, the vast majority of DNA damage is observed in ejaculated sperm, thus indicating that SDF is mainly a post-testicular event (10, 27, 33, 34).

Importantly, we used the SCD method combining a dual fluorescent probe to target both the DNA and proteins. This method allows us to discriminate spermatozoa from other cell elements in testicular suspensions. A clear differentiation between sperm and nonsperm cells is possible because most protamine residues are removed after protein depletion in spermatozoa, while histones that are abundant in nonsperm cells are virtually unaffected (22). The assessment of SDF in testicular specimens using this method is convenient when compared with the more complex assays, including TUNEL, sperm chromatin structure assay, and Comet. While it takes approximately 1.5 hours to assess SDF by SCD, the analysis would be 4 times longer using the technically challenging TUNEL assay (4). Additionally, the SCD test is more sensitive than TUNEL for the evaluation of SDF (4), while flow-cytometry techniques and the Comet assay are not fully operative in tissues because spermatozoa are mixed with somatic cells (18). Hence, protocol modifications will be required to first remove nonsperm cells, which may also eliminate spermatozoa, thus biasing the correct estimate of the true nature of SDF (35).

The applicability of the SCD test in testicular specimens was originally reported by Meseguer et al. to study the testicular sperm of men with azoospermia (36). Using bright-field microscopy, the investigators showed that the method was operative in testicular specimens and noted that %DFI was significantly higher in men with nonobstructive azoospermia compared with men with obstructive azoospermia. Yet the DFI results obtained in their study with the SCD method were not compared to other assays. A few years ago, our group tested

the validity of the SCD test in testicular sperm by studying a patient with Kartagener syndrome and recurrent fertilization failure (22). We used the SCD test as described in the present study and compared test results to those obtained with the two-dimensional Comet assay. The %DFI obtained with both methods was similar (SCD, 76.4%; Comet, 85.2%). These results were reassuring because the rationale of the SCD method is a two specific step process, namely, [1] controlled DNA denaturation and [2] controlled protamine depletion. Since the level of protamination in ejaculated and testicular sperm can be slightly different, it would therefore be possible that the SCD reagents generated different patterns in the chromatin structure. Additionally, in this case, we took advantage of the sample and performed a parallel DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization (DBD protocol) to assess DNA damage, which is a highly specific protocol based on in situ DNA hybridization using whole genomic DNA probes. Test results with the DBD method have been previously shown to be equivalent to those of SCD (21). In this aforementioned case study, testicular sperm labeled with DBD, which indicated the presence of DNA breaks, corresponded to those spermatozoa with small or no halo (indicative of DNA fragmentation by the SCD test). Despite not being validated in a large population, our group's above-mentioned experimental approach corroborated Meseguer et al.'s observations indicating that SCD was operative in testicular specimens and added to them by showing that test results were comparable to those obtained by both the two-dimensional Comet and DBD assays. Nevertheless, further validation of the SCD test results in testicular sperm is warranted.

It is well known that testicular sperm are more vulnerable to DNA damage owing to the fact that sperm chromatin protamines are not fully cross-linked by disulphide bonds until sperm traverse the epididymis (37). Previous studies have postulated that one of the mechanisms involved in SDF is oxidative stress-induced DNA damage during comigration of mature sperm with ROS-producing immature sperm through the epididymis (33, 34, 38–40). Exposure of mature testicular sperm to ROS, produced either by immature sperm or epithelial cells lining the epididymis, can result in sperm damage before disulphide cross-linking takes place (41). In fact, infertile men with oligozoospermia were found to have significantly higher oxidative parameters in the semen than fertile men (42). The increased levels of ROS in these subjects have been associated with environmental and lifestyle factors, advanced age, obesity, infection, and other diseases (40, 43). Although oral antioxidant intake has been commonplace, its effects to alleviate ROS-induced SDF are limited, and many patients still persist with high SDF after prolonged therapy (18). Comparing antioxidants to placebo or no treatment, SDF rates were shown to be reduced by only 13.8% (95% CI, 10.4 to 17.7;  $P<.0001$ ) (29). Therefore, the use of testicular spermatozoa retrieved from men with complete spermatogenesis, which may be exempted from the oxidatively induced DNA damage taking place in the epididymis, becomes an attractive alternative.

In our study, fertilization rates after sperm injections with testicular sperm were lower than those with ejaculated sperm. Similar results have been observed when azoospermic



(nonobstructive) and nonazoospermic men were compared (44–47). An impaired fertilization potential in the group of men with nonobstructive azoospermia might be explained by the inherent defective spermatogenesis (26). Although our population comprised men with relatively well-preserved spermatogenesis, unlike in nonobstructive azoospermia, it is possible that a few of the selected testicular sperm for injection carried deficiencies other than SDF, such as those related to the centrioles and genetic material, which ultimately affected the capability of the male gamete to activate the oocyte. In contrast, other investigators observed no significant differences in the fertilization rates when testicular sperm was compared to ejaculated sperm in cohorts of men with cryptozoospermia and obstructive azoospermia (31, 47).

As far as SDF measured by the SCD method is concerned, previous studies indicate that %DFI is not directly related to fertilization rates (36, 48). Despite not being apparent per fertilization, the influence of a damaged paternal chromatin can be observed after zygotic transcriptional activation and has been postulated to explain the impaired pregnancy outcome in ART (49). This type of damage is expressed during or after implantation and has been characterized as a late paternal effect. Although a negative correlation of sperm DNA damage and embryo development has been described (50–52), which seems to be modulated by the oocyte's inherent ability to repair sperm DNA damage before the first cleavage (52, 53), there was no evidence of such detrimental effects in our study. However, given that we assessed embryo quality on day 3 and the negative impact of SDF on embryo quality becomes more prominent later, it is possible that blastocyst development might be affected as a consequence of the damaged paternal chromatin (51).

Infertile men with high SDF in ejaculated sperm are more likely to achieve a pregnancy with ICSI than with IVF; this may be explained by the differences in the population treated and the sperm-handling techniques used in each method (54). Despite being applied successfully in cases of high SDF, ICSI using ejaculated sperm is associated with an increased incidence of pregnancy loss. In a recent meta-analysis involving 2,969 couples, the risk of miscarriage was increased by 2.16-fold when semen specimens with an abnormally high proportion of DNA damage were used for ICSI (95% CI, 1.54–3.03;  $P < .00001$ ) (3). Our data corroborate these findings, as higher miscarriage rates were observed in the couples subjected to ICSI with ejaculated sperm. In contrast, the relative risk of achieving a live birth was 1.76 higher in the couples who used testicular sperm.

Although our data indicate that the use of testicular sperm was associated with improved ICSI outcomes in men with oligozoospermia and persistent high SDF, this option should be reserved for selected men who have failed less invasive treatments for known and unknown causes of sperm DNA damage. While defective spermatozoa passing the testicular barrier can be eventually deselected via natural apoptotic-like processes (55), it is possible that testicular sperm originating from a subpopulation that would be blocked in its ontogeny during the maturation process is selected for TESTI-ICSI and carries putative deficiencies (56). Importantly, current evidence concerning the neonatal

profiles of babies born after ICSI using surgically retrieved gametes are reassuring (44, 45), but these data exclusively concern the subset of patients with azoospermia. The limited evidence favoring ICSI outcomes with the use of testicular sperm in men with high SDF calls for continuous monitoring until the safety of this strategy is confirmed. Any genetic and epigenetic effects in the offspring will require a more extensive investigation and long-term follow-up. Lastly, given the nonrandomized nature of our trial, it is possible that some bias exists, despite the homogeneity of the two cohorts compared. Therefore, further research is needed to confirm our findings.

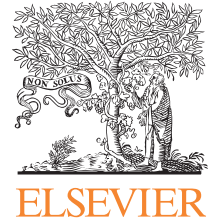
In conclusion, our data indicate that the use of testicular sperm was associated with improved ICSI outcomes in men with oligozoospermia and persistent high SDF. Consideration should be given to testicular sperm retrieval when performing ICSI in such cases, provided less invasive treatments for alleviating DNA damage have failed.

**Acknowledgment:** Fabiola C. Bento assisted with language revision.

## REFERENCES

- Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000;73:43–50.
- Esteves SC, Sharma RK, Gosálvez J, Agarwal A. A translational medicine appraisal of specialized andrology testing in unexplained male infertility. *Int Urol Nephrol* 2014;46:1037–52.
- Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012;27:2908–17.
- Feijó CM, Esteves SC. Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *Fertil Steril* 2014;101:58–63.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015;103:e18–25.
- Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:427–32.
- Abad C, Amengual MJ, Gosálvez J, Coward K, Hannaoui N, Benet J, et al. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrologia* 2013;45:211–6.
- Wang YJ, Zhang RQ, Lin YJ, Zhang RG, Zhang WL. Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele repair: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012;25:307–14.
- Raziel A, Friedler S, Schachter M, Kaufman S, Omanski A, Soffer Y, et al. Influence of a short or long abstinence period on semen parameters in the ejaculate of patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2001;76:485–90.
- Gosálvez J, González-Martínez M, López-Fernández C, Fernández JL, Sánchez-Martin P. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril* 2011;96:1083–6.
- Said TM, Grunewald S, Paasch U, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online* 2005;10:740–6.
- Sharma RK, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med* 2015;61:1–12.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Taraborrelli S, Arnone A, et al. Comparison of two ready-to-use systems designed for sperm-hyaluronic acid binding selection before intracytoplasmic sperm injection: PICSI vs. Sperm Slow: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril* 2012;98:632–7.

14. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* 2008;16:835–41.
15. Cassuto NG, Hazout A, Bouret D, Balet R, Larue L, Benifla JL, et al. Low birth defects by deselecting abnormal spermatozoa before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2014;28:47–53.
16. Gosálvez J, Migueles B, López-Fernández C, Sánchez-Martín F, Sánchez-Martín P. Single sperm selection and DNA fragmentation analysis: the case of MSOME/IMSI. *Nat Sci* 2013;5:7–14.
17. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20:226–30.
18. Moskovtsev SI, Jarvi K, Mullen JB, Cadesky KJ, Hannam T, Lo KC. Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment. *Fertil Steril* 2010;93:1142–6.
19. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al.ESHRE consensus on the definition of “poor response” to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;26:1616–24.
20. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO Press; 2010.
21. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 2005;84:833–42.
22. Nuñez R, López-Fernández C, Arroyo F, Caballero P, Gosálvez J. Characterization of sperm DNA damage in Kartagener's syndrome with recurrent fertilization failure: case revisited. *Sex Reprod Health* 2010;1:73–5.
23. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Braz J Urol* 2011;37:570–83.
24. Esteves SC, Miyaoka R, Orosz JE, Agarwal A. An update on sperm retrieval techniques for azoospermic males. *Clinics* 2013;68(Suppl 1):99–110.
25. Esteves SC, Varghese AC. Laboratory handling of epididymal and testicular spermatozoa: what can be done to improve sperm injections outcome. *J Hum Reprod Sci* 2012;5:233–43.
26. Esteves SC. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. *Asian J Androl* 2015;17:459–70.
27. Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SE. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999;5:831–5.
28. Smit M, Dohle GR, Hop WC, Wildhagen MF, Weber RF, Romijn JC. Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic. *Int J Androl* 2007;30:48–55.
29. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2014:CD007411.
30. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2014;102:998–1005.
31. Ben-Ami I, Raziell A, Strassburger D, Komarovskiy D, Ron-El R, Friedler S. Intracytoplasmic sperm injection outcome of ejaculated versus extracted testicular spermatozoa in cryptozoospermic men. *Fertil Steril* 2013;99:1867–71.
32. Weissman A, Horowitz E, Ravhon A, Nahum H, Golan A, Levan D. Pregnancies and live births following ICSI with testicular spermatozoa after repeated implantation failure using ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2008;17:605–9.
33. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001;16:1912–21.
34. Alvarez JG, Ollero M, Larson-Cook KL, Evenson DP. Selecting cryopreserved semen for assisted reproductive techniques based on the level of sperm nuclear DNA fragmentation resulted in pregnancy. *Fertil Steril* 2004;81:712–3.
35. Emiliani S, Van Den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Verdoodt M, Englert Y. Evidence of reduced single-stranded testicular sperm DNA from obstructive azoospermic men after 3 days of in-vitro culture. *Hum Reprod* 2001;16:1200–3.
36. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, Remohí J, Fernandez JL. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 2009;92:1638–45.
37. Bedford JM, Bent MJ, Calvin H. Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1973;33:19–29.
38. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13:896–900.
39. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59:1037–46.
40. Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2014;28:684–703.
41. Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril* 2004;82:1443–5.
42. Aktan G, Doğru-Abbasoğlu S, Küçükgergin C, Kadioğlu A, Ozdemirler-Erata G, Koçak-Toker N. Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril* 2013;99:1211–5.
43. Esteves SC, Agarwal A. Novel concepts in male infertility. *Int Braz J Urol* 2011;37:5–15.
44. Esteves SC, Agarwal A. Reproductive outcomes, including neonatal data, following sperm injection in men with obstructive and nonobstructive azoospermia: case series and systematic review. *Clinics* 2013;68(Suppl 1):141–9.
45. Esteves SC, Prudencio C, Seol B, Verza S, Knoedler C, Agarwal A. Comparison of sperm retrieval and reproductive outcome in azoospermic men with testicular failure and obstructive azoospermia treated for infertility. *Asian J Androl* 2014;16:602–6.
46. Ghanem M, Bakr NI, Elgayaar MA, El Mongy S, Fathy H, Ibrahim AH. Comparison of the outcome of intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia in the first cycle: a report of case series and meta-analysis. *Int J Androl* 2005;28:16–21.
47. Verza S Jr, Esteves SC. Sperm defect severity rather than sperm source is associated with lower fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Int Braz J Urol* 2008;34:49–56.
48. Nuñez-Calonge R, Caballero P, López-Fernández C, Guijarro JA, Fernández JL, Johnston S, et al. An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reprod Sci* 2012;19:1163–8.
49. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod* 2014;29:2402–12.
50. Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 2006;12:466–72.
51. Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, et al. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 2014;29:904–17.
52. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2011;95:124–8.
53. Jin J, Pan C, Fei Q, Ni W, Yang X, Zhang L, et al. Effect of sperm DNA fragmentation on the clinical outcomes for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in women with different ovarian reserves. *Fertil Steril* 2015;103:910–6.
54. Lewis SE. Should sperm DNA fragmentation testing be included in the male infertility work-up? *Reprod Biomed Online* 2015;31:134–7.
55. García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, et al. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril* 2011;95:105–9.
56. Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Alvarez JG, Fernandez JL. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl* 2007;28:38–49.



## Article

## Magnetic cell sorting of semen containing spermatozoa with high DNA fragmentation in ICSI cycles decreases miscarriage rate

**Pascual Sánchez-Martín<sup>a</sup>, Mónica Dorado-Silva<sup>a</sup>,  
Fernando Sánchez-Martín<sup>a</sup>, Mercedes González Martínez<sup>a</sup>,  
Stephen D Johnston<sup>b</sup>, Jaime Gosálvez<sup>c,\*</sup>**

<sup>a</sup> GINEMED, Farmacéutico Murillo Herrera, 3, Sevilla 41010, Spain

<sup>b</sup> School of Agriculture and Food Science, The University of Queensland, Gatton 4070, Australia

<sup>c</sup> Unit of Genetics, Department of Biology, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 20849, Spain



Jaime Gosálvez is Professor of Genetics at the University Autónoma de Madrid, Spain. In a research career spanning 40 years, he has published 345 journal articles and 23 book chapters, has been editor of two books, has contributed to five patents and has been a principal investigator of 21 national and international competitive projects.

### KEY MESSAGE

While the MACS procedure combined with differential centrifugation in autologous and donor oocyte ICSI failed to improve live birth rate in this study, it did appear to reduce the incidence of miscarriage compared with ICSI conducted using only differential centrifugation.

### ABSTRACT

This retrospective cohort study investigated whether reproductive outcome could be improved in couples presenting with a high level of sperm DNA fragmentation (SDF) by treating the ejaculate with the magnetic cell sorting (MACS) sperm selection procedure in combination with prior density gradient centrifugation (DGC). Only men presenting with  $\geq 30\%$  sperm DNA in the ejaculate were included because these patients can be potentially treated with MACS to reduce the proportion of sperm presenting DNA damage. In total, 305 couples were included in this study, and from these, 216 women underwent autologous ICSI (AUTO-ICSI), whereas the remaining 89 participated in oocyte donor ICSI (DONOR-ICSI). Ejaculates were collected and DGC treated with and without MACS. Live birth and miscarriage rates resulting from ICSI observed after clinical pregnancy were determined. Sperm selection using DGC or a combination of DGC and MACS did not show any statistical difference with respect to live birth rate of couples undergoing either AUTO-ICSI or DONOR-ICSI, irrespective of whether the couples had a moderate ( $\geq 30$  to  $< 50\%$ ) or high ( $\geq 50\%$ ) level of SDF. Remarkably, there was no evidence of miscarriage in either cohort of patients (AUTO-ICSI or DONOR-ICSI) following the MACS procedure.

© 2017 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author.

E-mail address: [jaime.gosalvez@uam.es](mailto:jaime.gosalvez@uam.es) [J Gosálvez].

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.01.015>

1472-6483/© 2017 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Pascual Sánchez-Martín, et al., Magnetic cell sorting of semen containing spermatozoa with high DNA fragmentation in ICSI cycles decreases miscarriage rate, Reproductive BioMedicine Online (2017), doi: 10.1016/j.rbmo.2017.01.015

## Introduction

A high level of sperm chromatin integrity (both DNA and protamine) is essential for effective transmission of genetic information to the oocyte and the development of offspring [Nasr-Esfahani et al., 2005; Simon et al., 2011]. In fact, where standard parameters of sperm quality have been assessed (motility, morphology, concentration and plasma membrane integrity), it has been shown that DNA quality is better in individuals that exhibit a normal semen analysis, when compared with those presenting with abnormal semen [Zini and Libman, 2006]. A systematic review by Zini [2011] has shown that while abnormal sperm chromatin or damaged DNA can result in a lower pregnancy rate following natural insemination, intrauterine insemination and IVF, studies of pregnancy outcome after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are less conclusive. Nevertheless, Zini [2011] also concluded that there was sufficient evidence not to rule out the possibility that very high levels of sperm DNA damage can impact on ICSI and that sperm DNA assessment was of clinical value in testing infertile couples prior to assisted reproductive technologies and those experiencing recurrent miscarriages.

It is also the case that in every ejaculate of all mammalian species so far studied there exists a certain proportion of spermatozoa that contain fragmented DNA [Gosálvez et al., 2015]. In fact, Avendaño et al. [2009] showed that over 50% of sperm with normal morphology from some infertile patients were positive for terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labelling (TUNEL), such that under these circumstances one out of every two oocytes was potentially inseminated via ICSI with fragmented sperm DNA. Given this phenomenon, and in order to maximize reproductive outcome when conducting ICSI, it would seem prudent that once the ejaculate has been collected, one should attempt to remove sperm cells with damaged DNA prior to fertilization in order to increase the probability of obtaining better quality embryos and a higher rate of pregnancy.

A number of different strategies have been developed to select 'the best possible sperm' and thereby reduce the number of spermatozoa with damaged DNA prior to the ICSI procedure [McDowell et al., 2014; Nasr-Esfahani et al., 2012; Said et al., 2008; Sakkas, 2013]. PICS (physiological ICSI) allows sperm selection based on the capacity of spermatozoa to bind hyaluronic acid in a medium. Spermatozoa that are selected with PICS typically show good morphology, a low frequency of aneuploidy and low levels of sperm DNA fragmentation (SDF) [Nasr-Esfahani et al., 2008; Parmegiani et al., 2010]. Intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection (IMSI) is a method for assessing sperm morphology at high magnification ( $\times 6300$ ) by means of Nomarski interference contrast microscopy; this approach is designed to select spermatozoa based on 'normal' morphology. While some studies have demonstrated an improved fertility outcome when using spermatozoa selected by IMSI [e.g. Antinori et al., 2008; Bartoov et al., 2003; Hazout et al., 2006], a study by Avendaño et al. [2009] also revealed that even morphologically normal spermatozoa of infertile men recovered after a swim-up procedure can still show a high incidence of DNA fragmentation.

The use of monoclonal antibodies to identify apoptotic cells through magnetic cell sorting (MACS) has been proposed with the specific purpose of removing spermatozoa containing damaged DNA in the neat ejaculate or after the sperm sample has been treated with previous sperm washing-selection procedures, such as swim-up or density gradient centrifugation (DGC) [Alvares-Sedó et al., 2010; Bucar et al., 2015; De Vantery-Arrighi et al., 2009; Rawe et al., 2010]. Using the

MACS methodology, improvement has been reported in (i) sperm quality [De Vantery-Arrighi et al., 2009; Huang et al., 2009; Tavalae et al., 2012], (ii) fertilization rate [Grunewald et al., 2009; Romany et al., 2010], (iii) embryo quality [Grunewald et al., 2009; Romany et al., 2014] and (iv) pregnancy rate [Alvares-Sedó et al., 2010; De Vantery-Arrighi et al., 2009; Rawe et al., 2010]. The success of this procedure has primarily been attributed to the fact that MACS reduces the level of SDF [Herrero et al., 2012; Rawe et al., 2009] and that it has the capacity to differentiate apoptotic from non-apoptotic spermatozoa [Buzzi et al., 2010; De Vantery-Arrighi et al., 2009; Huang et al., 2009]. Tavalae et al. [2012] have also shown that while both MACS or DGC applied in unison and/or in combination can reduce the level of SDF, there was no difference in the percentage of SDF irrespective of the order in which these two procedures were conducted.

The aim of the current study was to determine whether live birth rate could be improved in those couples presenting with a high level of SDF by treating the ejaculate with the MACS procedure following a standard gradient centrifugation (DGC) protocol. The putative beneficial effects of the MACS protocol were assessed in two different groups of patients: (i) couples that underwent autologous-ICSI and (ii) those in which donor oocytes were used for ICSI.

## Materials and methods

### Patient criteria for inclusion

This was a retrospective study that included 305 couples attending a clinic for assisted reproduction over 2 years; all the couples were assigned to ICSI following initial clinical assessment. To reduce the risk of bias in the experimental design, we excluded clinical cases with severe male factor infertility, so that the ejaculate had to have a minimum volume of 1.5 ml, a sperm concentration of at least  $5 \times 10^6$ /ml, a progressive motility of more than 15% and normal sperm morphology of  $\geq 1\%$ . All 305 male patients presented with SDF values  $\geq 30\%$  following evaluation of the neat semen sample 30 min after ejaculation and liquefaction. This assessment time was chosen to homogenize any possible negative impact of iatrogenic sperm damage on the samples [Gosálvez et al., 2011]. Women who displayed a poor response to ovarian stimulation protocols or who showed polycystic ovary syndrome, adenomyosis, endometriosis grade III and IV, hydrosalpinx, alterations of the endometrium, known genetic alterations and uterine malformations were excluded from this study, as were women diagnosed with pre-implantation genetic abnormalities. To be included in the study, each woman was required to have more than 5 metaphase II (MII) oocytes and fewer than 16 MII oocytes on the day of oocyte retrieval in autologous cycles.

### Experimental design and ethical approval

Based on these criteria, the couples were categorized based on (i) whether their own (autologous-ICSI: AUTO-ICSI) or donor (DONOR-ICSI) oocytes were used for ICSI, (ii) whether the male partner had an SDF value of  $\geq 30$  to  $< 50\%$  or  $\geq 50\%$  in their initial ejaculate and (iii) whether the MACS procedure was used or not. The experimental design and respective number of patients in each cohort is shown in **Table 1**. The basis of whether ICSI was conducted using the autologous or donor oocytes was primarily associated with the woman's age, as oocyte donation is regarded as the procedure of choice in

**Table 1 – Distribution of patients according to the levels of SDF within each cohort.**

Procedure		SDF $\geq 30$ to $< 50\%$		SDF $\geq 50\%$	
		DGC only	DGC + MACS	DGC only	DGC + MACS
AUTO-ICSI (216)	No.	144	42	23	7
	Female age $\pm$ SD	31.4 $\pm$ 5.1	32.7 $\pm$ 0.9	33.6 $\pm$ 0.9	34.2 $\pm$ 2.2
	% SDF $\pm$ SD	36.0 $\pm$ 5.0	37.0 $\pm$ 6.1	63.0 $\pm$ 13.0	55.0 $\pm$ 3.7
	% LBR (n)	54.2 (78)	54.8 (23)	34.8 (8)	42.9 (3)
	% Miscarriage (n)	3.5 (5)	0	8.7 (2)	0
DONOR-ICSI (89)	No.	40	29	11	9
	Female age $\pm$ SD	43.7 $\pm$ 0.8	42.3 $\pm$ 1.0	40.2 $\pm$ 1.5	45.9 $\pm$ 1.9
	% SDF $\pm$ SD	37.0 $\pm$ 5.3	35.0 $\pm$ 4.5	62.0 $\pm$ 7.1	60.0 $\pm$ 10.2
	% LBR (n)	60.0 (24)	72.4 (21)	45.5 (5)	55.6 (5)
	% Miscarriage (n)	5 (2.0)	0	9.1 (1)	0

AUTO-ICSI: autologous-ICSI; DONOR-ICSI: oocyte donor-ICSI; SDF: sperm DNA fragmentation; LBR: live birth rate; DGC: density gradient centrifugation; MACS: magnetic activated cell sorting. Values presented as mean  $\pm$  SD or % (n).

women over 39 years of age. The average age of the women within each group is shown in [Table 1](#); the mean age of donors was  $23.0 \pm 3.2$  years. Retrospective data analysis for this study was determined following consensus between the IVF clinic and two public universities (project BFU-2013-44290-R) and following ethical recommendations of all participating institutions. The study was approved by the ethical committee of Ginemed on 23 May 2015.

### Semen processing

Fresh ejaculates were left to liquefy for 30 min and then processed to assess the level of SDF using the Halosperm procedure (Halotech SL, Madrid, Spain); details of this procedure have been described in [Fernández et al. \(2005\)](#). For sperm selection, all samples were processed using a DGC protocol according to the manufacturer's instructions (Sperm Grade, SAGE Media, CA, USA). Following DGC, some of these sperm samples were further processed using the MACS procedure to remove apoptotic spermatozoa (Miltenyl Biotech, Madrid, Spain). In preparation for the MACS protocol, the sperm pellet was washed with the binder buffer included in the kit for 5 min, centrifuged at 300g again and the supernatant discarded. The pellet was then covered with 100  $\mu$ l of Annexin V and 0.5 ml of fresh binding buffer and re-suspended by gentle pipetting. After 15 min of incubation at 37°C, the sample was eluted through the column provided in the kit and collected directly in human tubal fluid media (CytoSpring, CA, USA).

### Ovarian stimulation protocol, ICSI, endometrial preparation and transfer

All women in the autologous-ICSI group were treated with an antagonist protocol without contraceptive pills. Gonadotrophin stimulation was conducted by means of recombinant FSH (Gonal-F, Merck-Serono) from the second day of the menstrual period. Based on the patient's age and body weight, the initial dose of gonadotrophin ranged from 225 to 300 IU/day. Monitoring of ovarian response commenced on day 7 of stimulation and the dose of gonadotrophin was adjusted according to the ovarian response, as monitored by ultrasound. When the leading follicles reached 14 mm in diameter, Ganirelix 0.25 mg (Orgalutran, MSD) was injected subcutaneously and repeated every day thereafter until hCG administration. A subcutaneous injection of 250  $\mu$ g of hCG (Ovitrelle, Merck-Serono) was administered once the majority of the follicles had reached a diameter of  $\geq 16$  mm.

Ultrasound guided oocyte retrieval was performed 36 h after the hCG injection. All the donors were administered the same protocol with the exception that they received oral contraceptive pills (30 mg Ethinyl oestradiol and 0.3 mg Norgestrel (Edelsin, Effik) prior to the menstrual cycle and the dose of recombinant FSH was lower, ranging between 150 and 200 IU/day depending on the woman's body mass index. Ovulation was controlled with triptorelin 0.2 mg (Decapeptyl, Ipsen Pharma). To achieve synchronization with the donor, the recipient received endometrial preparation for the transfer in the form of an increasing dose (2 to 6 mg/day) of oestradiol valerate (Meriestra, Novartis) until a hypo-echogenic endometrium thickness of at least 7 mm was achieved; from this stage of the procedure, the treatment was maintained until the day of the oocyte retrieval.

After retrieval, oocytes were washed in a G-MOPS medium (Vitrolife, Sweden), incubated in a culture medium (GIVF-plus; Vitrolife, Sweden) and then covered with mineral oil (Ovoil; Vitrolife, Sweden) for 2 h at 37°C and in 6% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub>. Cumulus cells were mechanically removed through a 30 s exposure to Hyase medium containing 80 IU/ml of hyaluronidase (Vitrolife, Sweden). Coronal cells were then gently removed by aspiration and the denuded oocytes evaluated for nuclear status. Oocytes that showed release of the first polar body were considered mature and, thus, chosen for ICSI; oocytes that had one, three or more pronuclei or were immature, deformed and post-mature were eliminated from the study.

An Eppendorf micromanipulator assembled on a Nikon inverted microscope was used to perform ICSI. The oocytes were examined 16–18 h after microinjection using a Nikon inverted microscope to determine the presence of pronuclei. Fertilized oocytes were cultured to evaluate their growth and cell division and then transferred to the patient. The day of the transfer depended on the number and development of the embryos and was ultimately decided according to the recommendation of the embryologist but typically ranged between day 2 and day 5; the majority of the transfers (83%) were conducted on day 3. Only fresh embryo transfers were conducted in this study. The maximum number of embryos allowed to be transferred was two and the decision as to whether one or two were transferred was left to the discretion of the couple. Most couples decided to transfer two embryos (94%); all of the remaining embryos were vitrified and stored. The ASEBIR-criteria for embryo classification were used ([Cortés et al., 2008](#)). Only embryos graded as A or B were transferred.

A clinical pregnancy was confirmed biochemically by beta hCG assay and the presence of embryonic sac and/or fetal heartbeat at

approximately 4 and 6 weeks after the last menstrual period, respectively. For the purposes of this study, miscarriage was defined as a loss during the first 20 gestational weeks of an initially diagnosed clinical pregnancy.

### Statistics

To test for homogeneity of the live birth or miscarriage results between the different experimental groups,  $2 \times 2$  contingency tables were constructed and compared using Pearson chi-squared value of  $\alpha = 0.05$ . SDF comparisons were determined using a non-parametric Mann-Whitney *U*-test. Analyses were performed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 19, IBM Corp., USA). *P*-values of  $<0.05$  were considered statistically significant.

### Results

Age of women in each cohort, SDF values and the rates of live birth and miscarriage within each pre-established group are presented in **Table 1**. There was no significant difference in the initial level of SDF observed between the DGC only and DGC + MACS groups (AUTO-ICSI / SDF  $\geq 30 - <50$ , Mann-Whitney *U*-test = 2096; DONOR-ICSI / SDF  $\geq 30$  to  $<50$ , *U* = 451; AUTO-ICSI / SDF  $\geq 50$ , *U* = 52; DONOR-ICSI / SDF  $\geq 50$ , *U* = 50.5).

For those couples that underwent AUTO-ICSI procedures using spermatozoa with initial SDF levels in the ejaculate of  $\geq 30$  to  $\leq 50\%$ , there was no significant difference in the live birth rate of oocytes injected with spermatozoa processed with DGC only and those with DGC + MACS (Pearson's chi-squared test;  $\chi = 0.005$ ; *P* = 0.970). A similar result was observed for patients undergoing DONOR-ICSI ( $\chi = 0.24$ ; *P* = 0.625). The same analysis was also conducted for the couples that completed the AUTO-ICSI procedure with spermatozoa with initial SDF levels in the ejaculate of  $\geq 50\%$  and once again there was also no significant difference in the live birth rate of semen samples with DGC only and DGC + MACS ( $\chi = 0.07$ ; *P* = 0.794). A similar finding was found when the DONOR-ICSI groups were compared ( $\chi = 0.07$ ; *P* = 0.795). Even when data for low and high initial levels of SDF were pooled and analysed, there was still no difference in the live birth rate between DGC and DGC + MACS treated spermatozoa for either AUTO-ICSI ( $\chi = 0.01$ ; *P* = 0.913) or DONOR-ICSI ( $\chi = 0.29$ ; *P* = 0.591).

To investigate whether the DGC-MACS sperm selection procedure provided any significant benefit to reproductive outcome when compared with only DGC, the frequency of clinical pregnancy and miscarriages for AUTO-ICSI and DONOR-ICSI were compared (**Table 2**).

**Table 2 – Frequency of clinical pregnancy and miscarriage in couples where sperm samples were treated with DGC alone or DGC with MACS prior to autologous or oocyte donor ICSI.**

Parameter	DGC only	DGC + MACS
AUTO-ICSI		
Clinical pregnancy	93	26
Miscarriage	7	0
DONOR-ICSI		
Clinical pregnancy	32	26
Miscarriage	3	0

AUTO-ICSI, autologous-ICSI; DONOR-ICSI, oocyte donor-ICSI; DGC, density gradient centrifugation; MACS, magnetic activated cell sorting.

While both cohorts of patients in which the oocyte was injected with spermatozoa treated with only DGC showed evidence of miscarriage, there was no incidence of miscarriage in those patients whose oocytes were injected with sperm following the DGC + MACS procedure. Contingency chi-squared analysis of these data showed a significant difference between clinical pregnancy versus miscarriage rates between couples where ICSI (AUTO and DONOR) was conducted with DGC only (clinical pregnancy – 125 / miscarriage – 10) and with DGC + MACS (clinical pregnancy – 52 / miscarriage – 0) (contingency chi-squared = 4.069; *P* = 0.0436).

### Discussion

The results presented in this retrospective study revealed that the live birth rate from either AUTO-ICSI or DONOR-ICSI using spermatozoa selected following the MACS procedure showed no statistically significant differences when moderate ( $\geq 30$  to  $<50\%$ ) and high ( $\geq 50\%$ ) SDF groups were compared. Nevertheless, in both the AUTO-ICSI and DONOR-ICSI groups, the MACS procedure appeared to be extremely efficient at removing spermatozoa potentially involved in producing embryo malformation giving rise to miscarriage. Overall, a live birth rate of 52.8% was achieved when spermatozoa were selected using DGC only, whereas a live birth rate of 59.8% was obtained when spermatozoa treated for DGC + MACS were used; while these results were not statistically significantly different, the trend towards improvement with the use of DGC + MACS may be related to the size of the cohorts that were created in this retrospective analysis, so that inclusion of a larger cohort of patients may have resulted in a significant improvement in reproductive outcome following the MACS procedure, similar to that observed by [García-Ferreira et al. \(2014\)](#). Nevertheless, the results of our analysis are similar to those reported by [Romany et al. \(2014\)](#), who showed that the MACS procedure failed to improve live birth rate. These authors used oocyte donors but did not control for the level of DNA damage and consequently left open the possibility that only patients with confirmed high levels of apoptosis and/or DNA fragmentation could especially benefit from the MACS sperm selection procedure.

Although the MACS procedure may result in improved assisted reproduction success, the reported outcomes are variable and it is still uncertain as to in which stage of the reproductive process this improvement is being made. For example, [García-Ferreira et al. \(2014\)](#) reported that fertilization, embryo quality, implantation and pregnancy rates were all improved when patients affected by high levels of SDF had their semen processed with the MACS procedure; however, it should be noted that non-treated MACS spermatozoa of these same patients with high SDF were not used as a control. A meta-analysis and mini-review conducted by [Gil et al. \(2013\)](#), and which included 499 patients from different prospective randomized trials, concluded that while sperm selection using MACS resulted in significant improvements in pregnancy rate, when compared with classical techniques for sperm selection (such as swim-up or DGC), there was no difference between implantation and miscarriage rates. Although the MACS sperm selection procedure has been shown to improve reproductive outcomes in couples undergoing both AUTO-ICSI and DONOR-ICSI ([Buzzi et al., 2010](#)), in other cases it appears that the MACS procedure was unable to improve reproductive outcome in DONOR-ICSI cycles ([Romany et al., 2014](#)).

It is also interesting to note that the general improvement in reproductive outcome reported by different authors can be applied across

different assisted reproduction strategies; for example, the MACS sperm selection procedure has also been reported as being beneficial when using intrauterine insemination (Romany et al., 2010) and ICSI (Rawe et al., 2010; Vilela et al., 2011). Given that MACS is a technique directed to solve the male factor infertility, it is puzzling that many studies that report its use provide no corresponding specific reference to the type of male factor being treated (e.g. oligozoospermic, asthenozoospermic, teratozoospermic). Hence, the possibility exists that some patient groups may be benefiting more than others when using this technique, depending on the initial cause of male infertility (Herrero et al., 2012). Irrespective, the MACS sperm selection procedure when used in conjunction with ICSI gives rise to what appear to be healthy offspring (Polak de Fried and Denaday, 2010; Rawe et al., 2010; Van Thillo et al., 2011). While all these observations are helpful, further systematic controlled studies are required whereby homogeneous groups can be directly compared in order to establish the efficacy of the MACS procedure in improving reproductive outcome.

The complete lack of miscarriage observed in both AUTO-ICSI and DONOR-ICSI groups following MACS sperm selection in the current study is a fascinating finding that requires further investigation. We suggest that the most plausible explanation for this observation is that while the MACS treatment employed in our study was unable to remove enough of the DNA damaged sperm sub-population to show a statistical difference in live birth rate, it did appear to have the capacity to select out those spermatozoa potentially contributing to miscarriage. The MACS procedure has the potential to detect and remove a large proportion of spermatozoa undergoing apoptosis, some of which are also likely to contain double strand breaks in their genome. While the presence and persistence of double strand breaks in ejaculated spermatozoa can be easily demonstrated (Cortés-Gutiérrez et al., 2014), their significance in the sperm cell for reproductive outcome is still not well understood, because DNA replication or repair is not possible post-meiosis. Based on the origin of DNA fragmentation in sperm cells we might also expect to see different DNA lesion types that would not only be diagnostic in terms of their pathology, but also in terms of their potential effect on reproductive outcome. For example, nucleases (either endogenous or exogenous) should produce single and/or double strand breaks, whereas DNA breaks produced by chromatin remodelling during spermiogenesis might correspond to double strand breaks that are mainly produced by topoisomerase II (Cortés-Gutiérrez et al., 2014; Laberge and Boissonneault, 2005). Sperm DNA damage composed mainly of a low level of single strand breaks, abasic sites, and/or base damage of different aetiologies, may have the potential to be repaired by oocytes and present no impediment to normal embryo development. However, given the diverse aetiologies of SDF, we may expect scenarios in which the DNA of the male pronucleus may function normally during syngamy and early embryonic development but that some misrepaired or unrepaired DNA lesions could still potentially lead to mutations or chromosome aberrations.

Using the MACS procedure, we are presumably removing a large part of double strand breaks contained in apoptotic spermatozoa; this type of lesion is considered one of the most toxic and must be repaired to preserve chromosomal integrity (Mehta and Haber, 2014). Consequently, by removing apoptotic targeted cells, it is possible that we could also be removing a large proportion of spermatozoa with double strand breaks and thereby reducing the chance that one of these spermatozoa will be selected to fertilize the oocyte. Unrepaired single strand breaks or other lesion types can also result in double strand breaks while the DNA is replicating in the embryo, leading to

structural chromosomal abnormalities (Marchetti et al., 2007); if these chromosome arrangements are unstable, they are likely to affect the correct mitotic segregation of chromosomes, resulting in genomic instability and cell death, and thereby adversely affecting embryo development. When DNA repair is complete, the morula and blastocyst stages can be achieved and the paternal genome should be expressed normally at this stage, so that a pregnancy would be more likely. If the repair processes are not very efficient, blastocyst arrest or spontaneous miscarriage may result (Cortés-Gutiérrez et al., 2014; Fatehi et al., 2006). Hence, a possible explanation for the decreased miscarriage rate observed in our study could be the removal of apoptotic cells containing double stranded DNA breaks by the MACS procedure.

While a larger, more homogeneous patient base may be necessary to confirm an improvement in live birth rate, our results appear to suggest that DGC followed by the MACS sperm selection procedure in combination with ICSI (autologous or donor oocyte) has the potential to dramatically reduce the incidence of miscarriage in ICSI-derived pregnancies. Further studies are required to explore the widespread use of the MACS procedure to improve reproductive outcome across a broad range of male factor infertility, especially those factors that may be associated with sperm DNA damage.

## Acknowledgements

This investigation was part of experimental protocols conducted under the research project BFU-2013-44290-R, as approved by the Universidad Autónoma de Madrid and in accordance with the ethical committees of the participating IVF clinics.

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 26 July 2016

Received in revised form 25 January 2017

Accepted 26 January 2017

*Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.*

### Keywords:

Density gradient centrifugation

ICSI

Magnetic cell sorting (MACS)

Male factor

Miscarriage

Sperm DNA fragmentation

## REFERENCES


- Alvares-Sedó, C., Uriondo, H., Lavolpe, M., Noblia, F., Papier, S., Nodar, F., 2010. Clinical outcome using non-apoptotic sperm selection for ICSI procedures: report of 1 year experience. *Fertil. Steril.* 94 (Suppl. 4), S232.
- Antinori, M., Licata, E., Dani, G., Cerusico, F., Versaci, C., d'Angelo, D., Antinori, S., 2008. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod. Biomed. Online* 16, 835–841.

- Avendaño, C., Franchi, A., Taylor, S., Morshedi, M., Bocca, S., Oehninger, S., 2009. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 91, 1077–1084.
- Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosovsky, A., Yagoda, A., Lederman, H., Artiz, A., Gross, M., Barak, Y., 2003. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil. Steril.* 80, 1413–1419.
- Bucar, S., Gonçalves, A., Rocha, E., Barros, A., Sousa, M., Sá, R., 2015. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 147–154.
- Buzzi, J., Valcarcel, A., Lombardi, E., Osés, R., Rawe, V., Young, E., 2010. Magnetic activated cell sorting (MACS) improves oocyte donation results associated to severe male factor infertility. *Hum. Reprod.* 25 (Suppl. 1), i118–i152.
- Cortés, J.L., Ligeró, G., Sánchez, L., Nieto, A., Bueno, C., Montes, R., Menéndez, P., 2008. Morphological assessment of human oocytes, early embryos and blastocysts proposed by ASEBIR. *ASEBIR* 14, 6–13. <http://revista.asebir.com/criterios-de-valoracion-morfologicos-de-oocitos-preembriones-tempranos-y-blastocistos-humanos-propuestos-por-asebir/>. [Accessed 6 January 2017].
- Cortés-Gutiérrez, E.I., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Dávila-Rodríguez, M.I., Johnston, S.D., Gosálvez, J., 2014. Interpreting sperm DNA damage in a diverse range of mammalian sperm by means of the two-tailed comet assay. *Front. Genet.* 5, 404.
- De Vantery-Arrighi, C., Lucas, H., Chardonens, D., Agostin, A., 2009. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 1.
- Fatehi, A., Bevers, M.M., Schoevers, E., Roelen, B.A., Colenbrander, B., Gadella, B.M., 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.* 27, 176–188.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., Lafrombois, M.E., De Jonge, C., 2005. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil. Steril.* 84, 833–842.
- García-Ferreira, J., Villegas, L., Romero, R., Zavala, P., Hilario, R., Dueñas-Chacón, J., 2014. High pregnancy and implantation rates can be obtained using magnetic-activated cell sorting (MACS) to selection spermatozoa in patients with high levels of spermatid DNA fragmentation. *JFIV Reprod. Med. Genet.* 3, 133. <http://dx.doi.org/10.4172/2375-4508.1000133>.
- Gil, M., Sar-Shalom, V., Melendez Sivira, Y., Carreras, R., Checa, M.A., 2013. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30, 479–485.
- Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gouraud, A., Holt, W.V., 2011. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 951–961.
- Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Esteves, S.C., Johnston, S.D., 2015. Unpacking the mysteries of sperm DNA fragmentation: ten frequently asked questions. *J. Reprod. Biotech. Fertil.* 4, 1–16.
- Grunewald, S., Reinhardt, M., Blumenauer, V., Said, T.M., Agarwal, A., Abu Hmeidan, F., Glander, H.J., Paasch, U., 2009. Increased sperm chromatin decondensation in selected non-apoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil. Steril.* 92, 572–577.
- Hazout, A., Dumont-Hassan, M., Junca, A.M., Cohen Bacrie, P., Tesarik, J., 2006. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod. Biomed. Online* 12, 19–25.
- Herrero, M.B., Delbes, G., Troueng, E., Holzer, H., Chan, P.T.K., 2012. Differential enrichment of sperm with no DNA strand breaks using magnetic activated cell sorting (MACS) in men with various categories of semen parameters. *Hum. Reprod.* 27 (Suppl. 2), ii121–ii150.
- Huang, C., Lee, T., Chen, C., Wu, G., Lee, C., Lee, M., 2009. Sperm preparation by magnetic-activated cell sorting improve the sperm-zona pellucida binding capacity and reduces apoptotic sperm. *Hum. Reprod.* 24 (Suppl. 1), i217–i218.
- Laberge, R.M., Boissonneault, G., 2005. On the nature of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol. Reprod.* 73, 289–296.
- Marchetti, F., Essers, J., Kanaar, R., Wyrobek, K.J., 2007. Disruption of DNA repair increases sperm derived chromosomal aberrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 17725–17729.
- McDowell, S., Kroon, B., Ford, E., Hook, Y., Glujovsky, D., Yazdani, A., 2014. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst. Rev.* (10), CD010461.
- Mehta, A., Haber, J.E., 2014. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016428.
- Nasr-Esfahani, M.H., Salehi, M., Razavi, S., Anjomshoa, M., Rozbahani, S., Moulavi, F., Mardani, M., 2005. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod. Biomed. Online* 11, 198–205.
- Nasr-Esfahani, M.H., Razavi, S., Vahdati, A.A., Fathi, F., Tavalae, M., 2008. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25, 197–203.
- Nasr-Esfahani, M.H., Deemeh, M.R., Tavalae, M., 2012. New era in sperm selection for ICSI. *Int. J. Androl.* 35, 475–484.
- Parmegiani, L., Cognigni, G.E., Bernardi, S., Troilo, E., Ciampaglia, W., Filicori, M., 2010. Physiologic ICSI: hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil. Steril.* 93, 598–604.
- Polak de Fried, E., Denaday, F., 2010. Single and twin ongoing pregnancy in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertil. Steril.* 94, 351, e15–e18.
- Rawe, V., Alvares-Sedó, C., Uriondo, H., Papier, S., Miasnik, S., Nodar, F., 2009. ICSI outcome using annexin V columns to select non-apoptotic spermatozoa. *Fertil. Steril.* 92 (Suppl. 3), S73–S74.
- Rawe, V.Y., Boudri, H.U., Alvarez Sedó, C., Carro, M., Papier, S., Nodar, F., 2010. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod. Biomed. Online* 20, 320–323.
- Romany, L., Meseguer, M., García-Herrero, S., Romero, J.L., Pellicer, A., Garrido, N., 2010. Magnetic activated sorting of non-apoptotic sperm result in improved embryo quality in ovum donation cycles with intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 25 (Suppl. 1), i8.
- Romany, L., Garrido, N., Motato, Y., Aparicio, B., Remohí, J., Meseguer, M., 2014. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertil. Steril.* 102, 1567–1575.
- Said, T.M., Agarwal, A., Zborowski, M., Grunewald, S., Glander, H.J., Paasch, U., 2008. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J. Androl.* 29, 134–142.
- Sakkas, D., 2013. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 99, 1023–1029.
- Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., Lewis, S.E., 2011. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod. Biomed. Online* 23, 724–734.
- Tavalae, M., Deemeh, M.R., Arbabian, M., Nasr-Esfahani, M.H., 2012. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 31–38.



- Van Thillo, G., Guidobono, M., Young, E., Ruiz Jorro, M.R., Vila, M., Rawe, V., 2011. Biological safety and live births after selection of nonapoptotic spermatozoa during ICSI. *Fertil. Steril.* 96 [Suppl. 3], S160–S161.
- Vilela, M., Tiveron, M., Lombardi, C., Viglierchio, M.I., Marconi, G., Rawe, V., 2011. Implantation potential after vitrification of embryos obtained using magnetic active sperm sorting combined with annexin V during ICSI. *Hum. Reprod.* 26 [Suppl. 1], i200.
- Zini, A., 2011. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst. Biol. Reprod. Med.* 57, 78–85.
- Zini, A., Libman, J., 2006. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 29, 495–500.

# Sperm DNA fragmentation in donors and normozoospermic patients attending for a first spermogram: Static and dynamic assessment

E. Tvrda<sup>1</sup>  | C. López-Fernández<sup>2</sup> | P. Sánchez-Martín<sup>3</sup> | J. Gosálvez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Nitra, Slovakia

<sup>2</sup>Unit of Genetics, Department of Biology, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Clinica Ginemed, C/Farmacéutico Murillo Herrera 3, Sevilla, Spain

## Correspondence

Eva Tvrda, Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Nitra, Slovakia.

Email: evina.tvrda@gmail.com

## Funding information

Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación, Grant/Award Number: BFU-2013-44290-R and RETOS program RTC-2016-4733-1

## Summary

Static assessment of sperm DNA Fragmentation (SDF at the time of ejaculation or sperm thawing when cryopreserved) and the dynamic assessment of SDF (SDF assessed after T2 hr, T6 hr and T24 hr of sperm thawing) were used to establish cut-off values associated with sperm donors when compared with closely related normozoospermic patients. Cryopreserved samples from donors revealed SDF levels two times lower in comparison with the patients. Donor sperm DNA exhibited a 2.5 times higher longevity when compared with the patients. Static values of SDF after thawing of approximately 11% identify the donors with a 71% of sensitivity and 84% specificity. With respect to the dynamic assessment, SDF increases of 2.3 per hr during the first 2 hr of incubation identify the donors with 70% of sensitivity and 66% of specificity. Creating the Rate of Combined Damage (RCD) defined as the product of SDF-T<sub>0</sub> by the increase in the damage registered during the first 2 hr of incubation (r-SDF-T<sub>0-2</sub>), an index of RCD = 22.2 units has an identification capacity of donors with a 78% sensitivity and 77% specificity. Such cut-off values could be used to characterise donors with high chromatin resistance to damage when meeting the above-established criteria.

## KEYWORDS

fertility, male factor, sperm DNA fragmentation, sperm donors

## 1 | INTRODUCTION

With the development of assisted reproductive technologies (ARTs), numerous infertile couples are able to achieve homologous conception with artificial insemination (AI) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Nevertheless, in spite of major progress observed with respect to the management of male reproductive dysfunction, employment of donor spermatozoon might be the only choice to achieve parenthood in numerous male factor infertile couples (Adams, Clark, Davies, & de Lacey, 2017; Hu et al., 2012).

The selection of human semen donors in Spain is performed in accordance with strict multifactorial requirements established by the Spanish Law 14/2006 of May 26, 2006, on human assisted reproduction techniques, defining a semen sample of good quality which will be subsequently used for the production of semen doses

with high fertility rates (Busardò, Gulino, Napoletano, Zaami, & Frati, 2014). It is a complex and multistep procedure involving a physical and karyotypic exam, blood and microbiological analyses, as well as an extensive family history to exclude sexually transmitted diseases, as well as identification of any possible physical and genetic malformation which could be eventually passed on to the offspring (Adams et al., 2017). At the same time, a standard spermogram has to meet the quality criteria for the semen sample including a satisfactory sperm concentration ( $\geq 50$  million/ml), motility ( $\geq 50\%$  progressive motility) and morphology ( $\geq 14\%$  spermatozoa presenting a normal morphology). Such sample is subsequently considered to be a specimen which will surpass the freeze-thawing process (Adams et al., 2017; Hu et al., 2012). This complex assessment represents a certain seal of assurance for women who will be fertilised either through AI or in vitro fertilisation (IVF) techniques using semen

samples from a cryobank (Busardò, Gulino, Napoletano, Zaami, & Frati, 2014; Speirs, 2011).

One parameter which has been widely overlooked in clinical settings to this date is the potential damage that sperm DNA may suffer or the predisposition for such deterioration while in vitro handling prior to fertilisation. The so-called iatrogenic damage is imperative in ARTs. Differential interspecific chromatin resistance to this particular damage has a component of genetic basis (Balhorn, Brewer, & Corzett, 2000; Gosálvez, Núñez, Fernández, López-Fernández, & Caballero, 2011; Oliva, 2006), but all species experience the loss of sperm quality after ejaculation (Gosálvez et al., 2011). Considering that semen samples aimed for cryopreservation undergo aggressive mechanical processes including centrifugation, washing and exposure to low temperatures, the assessment of sperm DNA fragmentation (SDF) represents a novel quality marker to be considered to enable a more efficient selection of semen donors (Alvarez Sedó et al., 2013; Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, et al., 2009; Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, et al., 2009; Gosálvez, et al., 2011; Gosálvez, et al., 2013). Such characteristic has been growing considerably in importance, as SDF represents a serious threat to the fertilisation success or embryogenesis (Coughlan et al., 2015; Hu et al., 2012; Jin et al., 2015).

Most studies regard SDF as a fairly static marker, providing information about the percentage of spermatozoa exhibiting fragmented DNA in a specific time moment. Nevertheless, SDF tends to rise correspondingly to the increasing time semen is exposed to ex vivo processing (Alvarez Sedó et al., 2013; Gosálvez et al., 2011, 2013; Yelumalai et al., 2012). The loss of sperm function following ex vivo manipulation correlates with the iatrogenic damage which may additionally affect other structures vital for sperm integrity and activity including biological membranes, acrosomes and mitochondria (Gosálvez, López-Fernández, Hermoso, Fernández, & Kjelland, 2014; Gosálvez et al., 2011; Santiso et al., 2012). As such, this time-dependent or “dynamic” behaviour gives rise to logarithmic to exponential growth of DNA damage in relation to incubation time may that is applied after thawing (Gosálvez et al., 2011).

In an earlier study, we have for the first time reported that human donors present with lower levels of DNA damage and higher chromatin stability when compared to the controls at the time of ejaculation (Gosálvez et al., 2013). Such characteristics may lead to a lower iatrogenic DNA damage during in vitro sperm manipulation, resulting in higher chances of reproductive outcome (Johnston et al., 2016).

The aim of the present investigation was to explore how the static and the dynamic assessment of SDF can be used to differentiate a group of sperm donors from closely related normozoospermic patients recruited while attending a clinic for first spermiogram. The general idea of this investigation was to generate sperm values associated to SDF variables that may identify donors with high chromatin resistance to damage for such variables.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

Semen samples were obtained from selected 110 donors (age of  $22.5 \pm 1.1$  years) with proven fertility at one clinic in Spain. The control

group comprised 100 normozoospermic males ( $33.5 \pm 5.9$  years old) who attended the same clinic searching for a fertility treatment associated to reproductive failure in the couple. All samples were collected from April to November 2016. In case of normozoospermic patients, all subjects had to accomplish the criteria for semen quality established by WHO (concentration  $\geq 15$  million/ml, motility  $\geq 40\%$  and morphology  $\geq 4\%$ ; Cooper et al., 2010). Institutional Review Board approval was not available at this private clinic. Patients provided an informed consent to use the specimen for the purposes of this investigation that otherwise would have been discarded.

Basic sperm characteristics and slide processing for DNA damage assessment were performed at the clinic. All samples were cryopreserved according to the protocols established at the clinic. Briefly, the samples were centrifuged at  $300 \times g$  for 5 min, the seminal plasma was discarded, and the resulting pellet was resuspended in G-Gamete buffer (Vitrolife, Sweden). Subsequently, the sample was placed on a vortex and 70% SpermFreeze™ single step freezing medium (FertiPro, Belgium) was added slowly to the sample. Each sample was placed at  $4^\circ\text{C}$  for 15–20 min, followed by a 15–20 min exposure to nitrogen vapours. Finally, the samples were submerged and stored in liquid nitrogen.

The level of sperm DNA damage was performed at the Department of Genetics, Universidad Autónoma de Madrid. Each frozen sample was placed into a water bath at  $37^\circ\text{C}$  for 10 s. After thawing, the sample was divided in two different volumetric aliquots. One was quickly used to assess SDF and was considered as SDF-t0. Following thawing, the samples were centrifuged at  $300 \times g$  for 5 min to eliminate the cryoprotective agents and media used for cryopreservation. The cell sediment was resuspended in modified HAM-HEPES-F10 medium (Irvine Scientific, CA, USA) without protein supplementation. The final sperm concentration was adjusted to 10 million/ml in all samples to perform the dynamic assessment of SDF. A uniform concentration of spermatozoa was crucial for this approach as the rate of SDF (r-SDF: increase in SDF per time unit after a period of incubation) is sperm concentration dependent (Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, et al., 2009; Gosálvez et al., 2013; Gosálvez et al., 2014). The aliquot after thawing, centrifugation and washing were considered as T0 (López-Fernández, Johnston, Fernández, Wilson, & Gosálvez, 2010).

To evaluate the longevity of sperm DNA when the samples are processed in vitro, we calculated the rate of SDF (r-SDF) as the increment of SDF in a specific timeframe (in this case hours) when spermatozoa are incubated in vitro under determined experimental conditions. In this study, the samples were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hr and the SDF values were assessed during specific incubation periods as follows: (i) Static value: SDF after 10 s of thawing (SDF-t0) (ii) Dynamic values: SDF values recorded after washing (SDF-T0), after 2 hr of incubation (SDF-T2), after 6 hr (SDF-T6) and after 24 hr (SDF-T24). The r-SDF was defined as the increase in SDF per time unit (hr). The periods of evaluation considered were r-SDF-T0-2, r-SDF-T0-6 and r-SDF-T0-24.

Sperm DNA fragmentation was assessed using the Dyn-Halosperm® (HalotechDNA, Madrid, Spain). Gelled aliquots of low-melting point agarose in Eppendorf tubes were provided in the kit, each one to process one semen sample. Eppendorf tubes were placed

in a water bath at 90–100°C for 5 min to fuse the agarose, and subsequently transferred to a water bath at 37°C. After 5 min of incubation for temperature equilibration at 37°C, 20 µl of the diluted semen was added to the Eppendorf tube and mixed with the fused agarose. Twenty µL of the semen-agarose mix was pipetted onto slides pre-coated with agarose provided in the kit and covered with a 20 × 20 mm coverslip. The slides were placed on a cold plate in the refrigerator (4°C) for 5 min to allow the agarose to turn into a microgel with the spermatozoa embedded within. The coverslips were gently removed and the slides immediately immersed horizontally into an acid solution for 7 min. Subsequently, the slides were horizontally immersed into a lysis solution for 20 min. After washing in distilled water for 5 min, the slides were dehydrated in 70% and 100% ethanol for 2 min each and finally air-dried.

The slides were stained using DAPI (2 µg/ml) (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and a minimum of 300 spermatozoa per sample were scored using an Epifluorescence Leica DMRB microscope using a dry 40 × fluorite magnification objective (Leica Microsystems, Barcelona, Spain).

All data were analysed using the SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL) program. The Wilcoxon signed-rank test was used to compare related samples, while the Mann-Whitney *U* test was applied to assess nonrelated samples. Finally, ROC (Receiver Operating Characteristic) curves were created to assess the sensitivity and specificity to determine the best donors as well to design predictive values for variables associated with the donor or the normozoospermic group.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Effect of sperm washing on SDF

Data concerning the different values of SDF observed in donors and in normozoospermic patients at different experimental conditions are represented in Table 1.

To test the effect of spermatozoon washing on the levels of sperm DNA fragmentation, SDF-t0 and SDF-T0 were compared within each group (donors and patients). The results showed significant differences between both values when patients were compared (SDF-t0: 16.56 ± 10.26; SDF-T0: 17.33 ± 10.89; Wilcoxon: *Z* -3.334; *p* .001). These differences were not apparent in the donor group (SDF-t0: 7.34 ± 4.51; SDF-T0: 7.67 ± 4.89; Wilcoxon: *Z* -1.636; *p* .102).

#### 3.2 | Static assessment of SDF

When the values of SDF at t0 and T0 were compared between both groups (donors and normozoospermic patients), significant differences were observed (*p* .000). In this case, the donor group presented SDF values 10 points lower than in the case of patients (Table 1).

#### 3.3 | Dynamic assessment of SDF

The dynamic analysis of SDF was based on the assessment of the time-dependent DNA longevity, that is increasing values of SDF recorded

in different time periods following sample incubation at 37°C. A summary of the main results is presented in Table 1, and differences were observed in all the cases when donors and normozoospermic patients were compared. In general, r-SDF in normozoospermic patients was significantly higher than the one observed in donors at all time-points. The most dramatic loss of sperm DNA quality occurring during the first 2 hr of incubation (Table 2).

Receiving Operating Characteristics curves (ROC analysis) were carried out to define the cut-off values, sensitivity and specificity associated with the static as well as dynamic DNA damage using two groups identified as donors and normozoospermic patients. The analysis studied the sensitivity and specificity, as well as the positive and negative predictive values of the data associated with SDF-t0, SDF-T0 and all the r-SDF obtained between the different time intervals. The ROC analysis results are displayed in Figure 1a. The area under the ROC curve, *p* values, confidence interval and SDF and r-SDF cut-off values corresponding to variables SDF-t0, T0, T2, T6, T24 are shown in Table 3. Moreover, positive and negative predictive values for the distribution of sperm DNA fragmentation values observed in donors and patients obtained at different time frames after thawing are displayed in Tables 4 and 5.

As presented in Table 3 and Figure 1, in general, SDF and r-SDF offer good values of AUC and all of them are able to discriminate donors from normozoospermic patients with an acceptable sensitivity and specificity (*p* < .05 for all the cases). However, some values are more accurate than others to produce discrimination between donors and normozoospermic patients. Thus, cut-off values for SDF-T0 = 11% classify donors with an approximate 70% sensitivity and 84% specificity (Table 3). When using values associated to r-SDF, r-SDF-T0-2 was the most accurate in establishing donor and normozoospermic patients discrimination. Cut-off values for r-SDF-T0-2 = 2.3 per hr classify donors with an approximate 70% sensitivity and 66% specificity (Table 3).

As the T0 and r-SDF-T0-2 rates were identified as the values offering the best discrimination, a correlation analysis was performed between both markers to test if these behave as independent variables.

**TABLE 1** Distribution of sperm DNA fragmentation values observed in donors and in normozoospermic patients obtained at different time frames after thawing

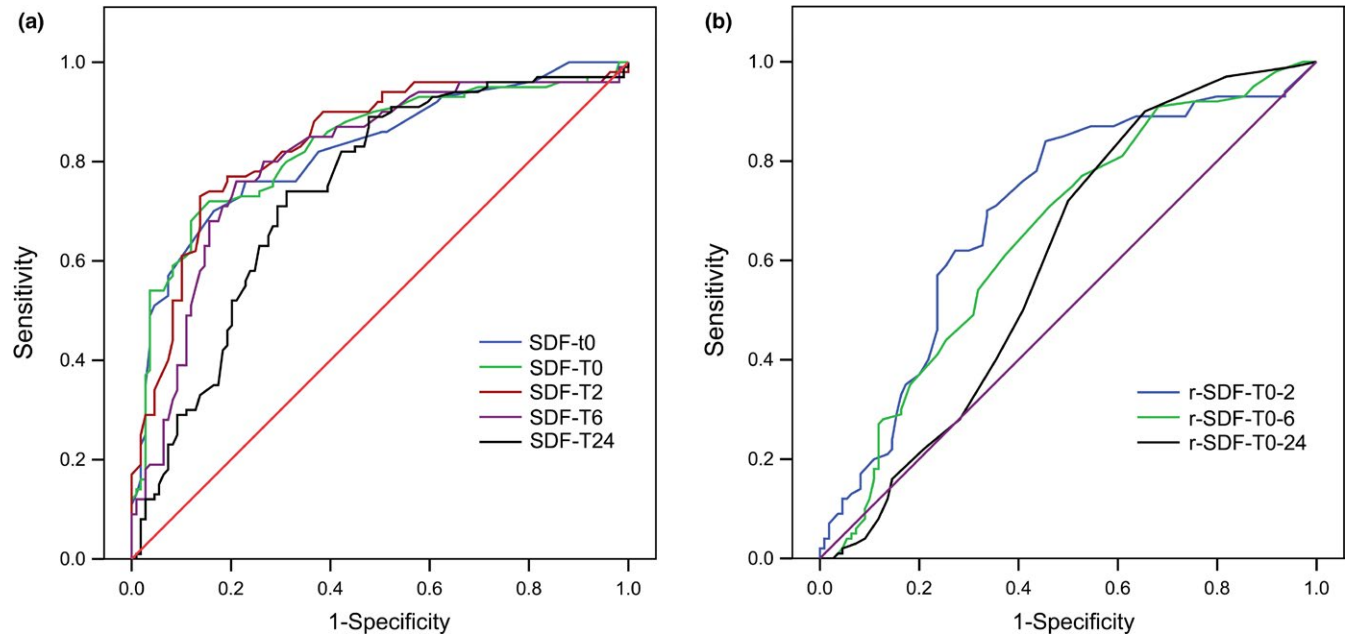
	Donors	Patients	(Mann-Whitney <i>U</i> ) <i>p</i>
SDF-t0	7.34 ± 4.51 (6.49–8.19)	16.56 ± 10.26 (14.54–18.60)	(1,951) .000*
SDF-T0	7.67 ± 4.89 (6.74–8.59)	17.33 ± 10.89 (15.17–19.49)	(1,868) .000*
SDF-T2	12.20 ± 6.56 (10.96–13.43)	24.88 ± 12.96 (22.31–27.46)	(1,782) .000*
SDF-T6	15.74 ± 8.39 (14.15–17.32)	27.62 ± 13.32 (24.98–30.26)	(2,123) .000*
SDF-T24	22.30 ± 13.92 (19.67–24.93)	32.79 ± 15.21 (29.77–35.81)	(2,838) .000*

\*Significant differences. The values are depicted as mean ± SD (CI 95%).

	r-SDF-T <sub>0-2</sub>	r-SDF-T <sub>0-6</sub>	r-SDF-T <sub>0-24</sub>
Patients	3.78 ± 2.66 (3.25–4.31)	1.71 ± 0.94 (1.53–1.90)	0.65 ± 0.30 (0.58–0.71)
Donors	2.27 ± 2.35 (1.83–2.72)	1.35 ± 1.10 (1.13–1.55)	0.61 ± 0.53 (0.52–0.72)
(Mann-Whitney U) p	(3340) .000*	(3847) .0002*	(4420) .0135*

\*Significant differences. The values are depicted as mean ± SD (CI 95%).

**TABLE 2** DNA damage increase (r-SDF) between the selected time periods of incubation (T<sub>0</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>6</sub>, T<sub>24</sub>). The r-SDF is expressed in units of SDF increase per hr



**FIGURE 1** Receiving Operating Characteristics curves for the variables used in the experiments. (a) Sensitivity and specificity distribution obtained for the different variables as defined in the Figure 1a insert. (b) Sensitivity and specificity obtained for the rate of sperm DNA fragmentation (r-SDF) at different time intervals as defined in the Figure 1b insert.

	AUC	p	CI 95%	SDF Cut-Off % (Sensitivity-Specificity)
SDF-t0	0.823	0	0.766–0.88	11 (70–84)
SDF-T0	0.83	0	0.773–0.887	11 (72–83)
SDF-T2	0.837	0	0.781–0.893	16 (77–80)
SDF-T6	0.805	0	0.744–0.867	20 (76–79)
SDF-T24	0.74	0	0.672–0.807	24 (71–70)
	AUC	p	CI 95%	r-SDF Cut-Off % (Sensitivity-Specificity)
r-SDF-T0-2	0.696	0	0.624–0.769	2.3 (70–66)
r-SDF-T0-6	0.65	0	0.576–0.725	3.4 (54–76)
r-SDF-T0-24	0.598	.01	0.521–0.676	1.35 (59–63)

**TABLE 3** Values of Receiving Operating Characteristics analysis obtained in the static and dynamic analysis

AUC, area under the curve; CI, confidence interval 95%; SDF, sperm DNA fragmentation SDF; r-SDF, rate of SDF.  
p value < .05.

In both cases (donors as well as normozoospermic patients), the correlation obtained between T<sub>0</sub> and r-SDF-T<sub>0-2</sub> was very low: Pearson  $-.071$ ;  $p = .460$  in the case of donors and Pearson  $.181$ ;  $p = .072$ , in case of normozoospermic patients (Figure 2).

As both variables turned out to be independent, we studied if a combination of both values could offer a better discrimination between the donors and the normozoospermic patients. To this purpose, we combined both independent variables (SDF-T<sub>0</sub> and r-SDF-T<sub>0-2</sub>)

**TABLE 4** Positive and negative predictive values for the distribution of sperm DNA fragmentation values observed in donors obtained at different time frames after thawing

	PPV	CI 95%	NPV	CI 95%
SDF-t0	0.699	0.365–0.657	0.852	0.718–0.986
SDF-T0	0.726	0.623–0.828	0.815	0.668–0.961
SDF-T2	0.769	0.676–0.863	0.818	0.657–0.979
SDF-T6	0.763	0.668–0.859	0.792	0.629–0.954
SDF-T24	0.716	0.613–0.819	0.692	0.515–0.869
r-SDF-T0-2	0.704	0.598–0.810	0.655	0.482–0.828
r-SDF-T0-6	0.500	0.099–0.900	0.755	0.668–0.824
r-SDF-T0-24	0.667	0.133–1.200	0.629	0.532–0.725

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

**TABLE 5** Positive and negative predictive values for the distribution of sperm DNA fragmentation values observed in normozoospermic patients obtained at different time frames after thawing

	PPV	CI 95%	NPV	CI 95%
SDF-t0	0.533	0.355–0.712	0.900	0.834–0.966
SDF-T0	0.548	0.373–0.724	0.911	0.839–0.974
SDF-T2	0.541	0.379–0.701	0.904	0.837–0.972
SDF-T6	0.528	0.365–0.691	0.919	0.857–0.981
SDF-T24	0.522	0.378–0.666	0.844	0.755–0.933
r-SDF-T0-2	0.529	0.392–0.666	0.797	0.694–0.899
r-SDF-T0-6	0.143	0.013–0.272	0.951	0.905–0.998
r-SDF-T0-24	0.116	0.020–0.212	0.955	0.905–1.005

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

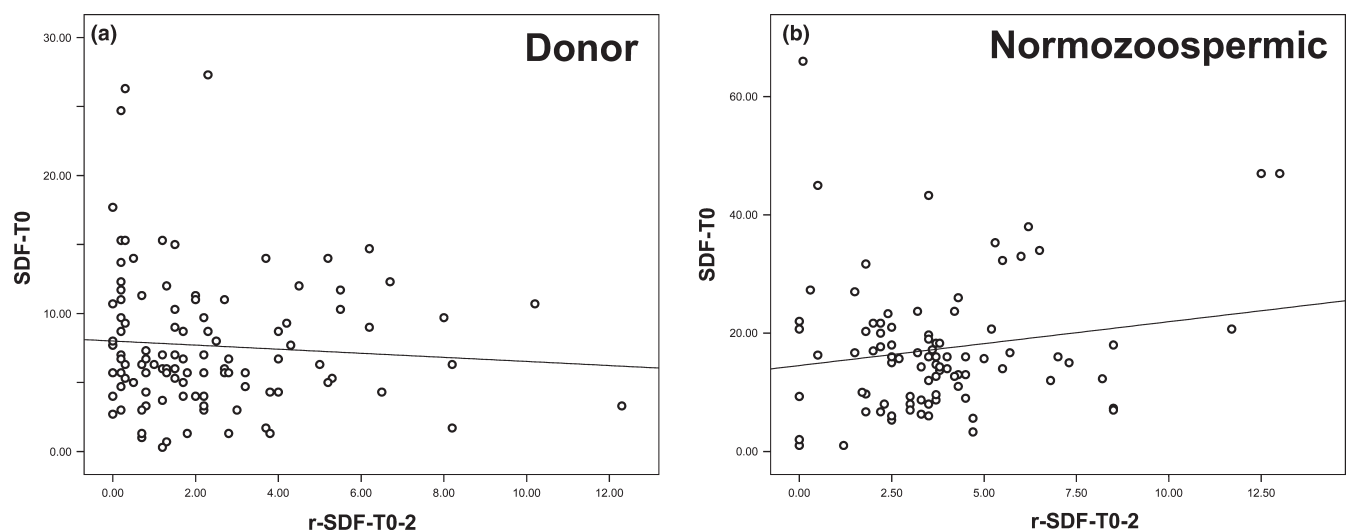
to express the Rate of Combined Damage (RCD) and defined as the product of SDF-T<sub>0</sub> by the increase in the damage registered during the first 2 hr of incubation (r-SDF-T<sub>0-2</sub>). Using this new panel of values, we

performed a new ROC analysis to study the sensitivity and specificity. In this case, the values for the area under the curve were equal to 0.816 with asymptotic confidence intervals at 95% of 0.754–0.877 for the superior or inferior limits respectively ( $p < .000$ ). RCD rates at 22.25 units were associated with 78% sensitivity and 77% specificity. The RCD rate offers slightly better sensitivity and specificity values than those obtained using the r-SDF-T0-2.

Applying the values derived from the ROC curves for SDF-T<sub>0</sub> ≤ 11%, the r-SDF-T<sub>0-2</sub> = 2.3 units per hr and a RCD ≤ 22.25 units, not all donors fulfilled the above-established requirements. In fact, only 50% of the donors met all three prerequisites listed in Table 6. Such individuals could be therefore defined as donors with a DNA of high stability and highly resistant to the iatrogenic damage, thus presenting with very low levels of DNA basal damage. About 27% of the donors may be considered to be out of this norm, although meeting at least two requirements. Applying the established criteria to the normozoospermic patients group, only 9% of this group could become hypothetical good quality donors as these comply with the cut-off values established for each of the markers (Table 6).

## 4 | DISCUSSION

Over the past years, numerous studies have emphasised on significant associations between poor sperm DNA integrity and impaired fertilisation (Jin et al., 2015), deteriorated implantation and early embryogenesis (Simon et al., 2014), miscarriages (Coughlan et al., 2015), birth defects and childhood cancers (Kumar, Chawla, Bisht, Yadav, & Dada, 2015). In general, most of these conclusions are derived from a static sperm DNA damage assessment obtained after ejaculation in fertile as well as infertile men. However, as we report using this experimental approach, a time-dependent, that is dynamic sperm DNA assessment, is also providing essential information to produce better identification of the best individuals for this characteristic. Last but not least,

**FIGURE 2** Graphs corresponding to the correlations obtained between the sperm DNA fragmentation at T0 (SDF-T0) and the corresponding rates of SDF after 2 hr of incubation (r-SDF-T0-2) in the donor group (a) and in normozoospermic patients

**TABLE 6** Table of double entry identifying the cut-off values for T0, r-SDF-T0-2 and RCD and the proportion of donors and normozoospermic patients meeting the criteria established at different levels

	SDF-T <sub>0</sub>	r-SDF-T <sub>0-2</sub>	RCD
Cut-off	<11%	<2.3/hr	<22.25 units
	Meet all 3 (%)	Meet at least 2 (%)	Meet 1 or 0 (%)
Donors	55 (50)	30 (27)	17 (15)
Patients	9 (9)	14 (14)	23 (23)

a combination of static and dynamic assessment of DNA integrity may represent a novel qualitative marker to elect suitable healthy and fertile men for donor programmes.

In general, most of the published information about sperm DNA damage only uses the baseline levels of SDF associated with the ejaculate and did not emphasise on sperm DNA longevity (Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, et al., 2009; Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, et al., 2009). SDF has been widely referred to as a steady parameter of sperm quality, lacking any specification of the period of time elapsed between the initial semen sample assessment and its use for ART. This is not the case, and as SDF may change rapidly when samples for ART are handled in vitro (Gosálvez et al., 2011; Gosálvez et al., 2014a; Santiso et al., 2012), a certain bias on the expected results of reproductive outcome is dependent of the true values of SDF at the time of fertilisation. This aspect, in humans, may be of major relevance in intrauterine insemination or in IVF fertilisation, as one would require high DNA stability in the spermatozoon that shall be waiting in the uterus or a Petri dish, to reach the mature oocyte. In fact, previous studies using sperm DNA longevity characteristics (Gosálvez et al., 2014a) revealed that fertility rates using damaged sperm DNA may not be largely affected, while the embryo quality decreased significantly following fertilisation. There are some references in humans to this putative loss of DNA quality with overnight semen delivery at distant sites away from the laboratory where the artificial insemination will be performed (Young et al., 2003).

Some additional information may be derived from this investigation. First of all, evidence has shown that centrifugation is differentially affecting the baseline level of SDF in the donors and the normozoospermic patient group. Centrifugation using patient sperm samples shows statistically significant differences between SDF-t0 and SDF-T0. At the same time, there is an increase in about 6% in the level of SDF in the samples after washing in the patient group. This effect, which is also present in the donor group, is not so evident. Such evidence is informing us of a higher DNA stability in the donor group when compared with patients after thawing and centrifugation. In normozoospermic patients, probably a portion of spermatozoa maintains a low level of undetectable SDF before sperm washing and this damage may be exposed and visualised after the insult of centrifugation. This interpretation is congruent with the observation about the existence of cryptic sperm DNA damage as reported by Santiso et al. (2012).

This study also reveals that the baseline level of SDF recorded in the donor group was significantly lower in comparison with the normozoospermic patient group. Additionally, sperm DNA longevity shows significant differences when both groups are compared. This observation is complementing earlier reports on a differential DNA stability in sperm samples that have been used under different conditions such as fresh, frozen-thawed and gradient processed ejaculates collected from human donors (Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, et al., 2009; Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, et al., 2009; Gosálvez et al., 2011, 2013). As DNA testing in donor selection programmes is not a standardised analysis, we may assume that a low level of SDF in the donor sample selection is currently performed by a totally empirical manner. This implies that SDF cannot be considered to have a neutral character. Thus, we may hypothesise that the donor selection procedures specific for each clinic provide for donor samples with a low level of DNA damage and a higher stability of the sperm DNA. This probably may rebound in a higher fertilisation success when using such specimens.

Our analyses revealed that DNA degradation (r-SDF-T0-2) in the donors was significantly slower (2.27 units per hr) during the first 2 hr of incubation than that observed in the normozoospermic patient group (3.78 units per hr). These results are in agreement with the tendency observed in our preliminary prospective study for this time period (Gosálvez et al., 2013). Significant differences are also found following assessing times periods (r-SDF-t0-6 and r-SDF-t0-24). However, the rates here observed were much lower as part of the spermatozoon has experienced DNA damage. Also, a tendency of lower values for all the periods considered in the case of the donors was noticed. The loss of sperm DNA integrity has been reported particularly when semen samples were exposed to increased temperatures. To demonstrate the detrimental effects of temperature changes on the sperm DNA integrity in clinical settings, Alvarez Sedó et al. (2013) established two groups of human semen samples exhibiting an initial SDF < 20% and >20%. Dynamic sperm DNA damage was assessed in neat, post-gradient/swim-up, 1 and 2 hr post-gradient/swim-up samples at room temperature or 37°C. Although SDF significantly decreased after centrifugation gradient and swim-up, regardless of the initial levels of the sample, all samples were more susceptible to a significant increase in DNA fragmentation over time following exposure to 37°C. Samples incubated at room temperature were lesser susceptible to a significant increase in DNA fragmentation. As the loss of sperm DNA quality seems inevitable when semen is handled ex vivo and the DNA damage extent may have a significant impact on a normal embryogenesis (Simon et al., 2014), a certain control over the existing or potential damage to the sperm cell should be considered when selecting the best donors. For logistic applications, our data indicate that it may not be necessary to perform dynamic analyses during periods longer than 2 hr, leading to a faster execution of the SDF assessment and offering the best discrimination values. For clinical applications, since the first 60–120 min after thawing are critical for an increasing SDF, special attention has to be paid to this timeframe, as the sperm DNA damage generated during this period could severely compromise the subsequent reproductive outcome.

It is obvious that not all donor specimens are equal, regardless of the selection requirements established by the appropriate legislation or by restrictions imposed by the clinics. The reason behind this reality may be partially explained by the variability associated with the factors contributing to the DNA integrity in male reproductive cells. The aetiology of SDF, much like male reproductive dysfunction, is multifactorial and may occur due to a variety of intrinsic or extrinsic factors. Intrinsic defects may include a low stoichiometric ratio of Protamine 1:Protamine 2 (Gujarro et al., 2015), aneuploidies (Muriel et al., 2007), alterations to the chromatin integrity (Rybar et al., 2009) or DNA packaging defects (Li et al., 2014). In addition, advanced paternal age (Simon et al., 2014), oxidative stress (Hosen, Islam, Begum, Kabir, & Howlader, 2015) and abortive apoptosis (Grunewald, Fitzl, & Springsguth, 2017) have been associated with sperm DNA damage (Wright, Milne, & Leeson, 2014). External factors such as heat (Rao et al., 2015), smoking (Taha, Ez-Aldin, Sayed, Ghandour, & Mostafa, 2012), genital tract inflammation (Fraczek, Szumala-Kakol, Dworacki, Sanocka, & Kurpisz, 2013), medication and hormonal alterations (Brezina, Yunus, & Zhao, 2012) are associated with an increased sperm DNA damage. Nevertheless, it should be assumed that such negative circumstances do not occur continuously in the case of subjects selected for donor programmes. The data obtained in this study indicate that DNA damage lower than 11% assessed at t0/T0, losses of DNA quality of approximately 2.3% per hr during the first 2 hr following thawing, and presenting a RCD  $\leq 22.25$ , could be considered as cut-off values to differentiate between donors and normozoospermic patients according to the characteristics considered by our experimental settings. Therefore, in case of normozoospermic patients, it is clear that deviations from the cut-off values may be associated with a worse fertility prognosis. In the case of the donors, values lower than those considered to establish the cut-off values can be indicative of donors with high chromatin resistance to damage for these characteristics. At the same time, the ROC data reinforce the hypothesis that some donors meet and other far exceed the cut-off values established to discriminate between donors and normozoospermic individuals.

Although this study presents novel data to be taken into consideration when assessing the quality of semen samples to be used in fertility clinics, our results need be validated prospectively, by showing that donors with the discussed "ideal" characteristics perform better than those who did not. Still, SDF testing faces similar shortcomings similarly to conventional semen analysis with respect to its ability to discriminate individuals who will or will not become pregnant naturally or by ARTs, as pregnancy is an endpoint widely influenced by a variety of other male or female factors. As such, a major limitation of our study is the fact that our data may only predict the ability of spermatozoa to contribute to a successful pregnancy, as a good quality donor is defined not only by sperm parameters but also by real-life fertility rates. Another interesting point that deserves further elaboration is the fact that although an increase in SDF rates was observed with incubation time, the magnitude of increase may not be of clinical significance for all comers. This observation supports a substantial variability which

has been observed in the donor semen quality between different donors (Adams et al., 2017; Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, et al., 2009; Gosálvez, Cortés-Gutiérrez, et al., 2009; Gosálvez et al., 2013) and clinical settings (Hu et al., 2012; Yelumalai et al., 2012), and which fortifies the need to approach and assess each semen sample individually.

## 5 | CONCLUSIONS

Results of this study have revealed that the donor sperm DNA exhibited a significantly higher longevity when compared with normozoospermic patients. By combining the static and dynamic values of SDF after thawing as well as by creating the Rate of Combined Damage, we are providing novel cut-off values for sperm DNA longevity that could be exploited to characterise donors with high chromatin resistance to fragmentation which could achieve higher fertilisation and pregnancy rates. At the same time, the dynamic assessment of SDF following 2 hr after thawing may be suggested as a valid tool to select highly fertile donors.

The quality requirements needed to be accomplished by an individual selected for semen donation include phenotypic, genotypic and physical characteristics as well as satisfactory semen characteristics. As the sperm quality has been decreasing in Western countries, meeting such strict minimal requirements leads to a significantly lower number of semen donors as well as to the use of semen samples considered as borderline for the conditions established as normal for the DNA quality. As such, disposing of additional strategies could be implemented to assure donor samples with low basal DNA damage and a high sperm DNA longevity, which could eventually compensate for a sperm concentration lower than  $50 \times 10^6$  sperm/ml. In the era of IVF and ICSI, it may be logical to assume that the DNA quality should be considered more seriously as neither a reduced sperm count nor motility resulting from *ex vivo* semen handling would represent obstacles for a successful fertilisation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to acknowledge Francisca Arroyo for technical assistance. This project was partially funded by the Spanish Government research grant BFU-2013-44290-R and RETOS program RTC-2016-4733-1. The funding body had no involvement in the study.

## ORCID

E. Tvrdá  <http://orcid.org/0000-0003-2895-1249>

## REFERENCES

Adams, D. H., Clark, R. A., Davies, M. J., & de Lacey, S. (2017). A meta-analysis of sperm donation offspring health outcomes. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8, 1–12.



- Alvarez Sedó, C., Barros, M. A., Uriondo Boudri, H., Rougier, N., Papier, S., & Nodar, F. (2013). Changes in DNA fragmentation during sperm preparation for ICSI over time. *JBRA Assisted Reproduction*, *17*, 109–114.
- Balhorn, R., Brewer, L., & Corzett, M. (2000). DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: Analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Molecular Reproduction and Development*, *56*, 230–234. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1098-2795](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1098-2795)
- Brezina, P. R., Yunus, F. N., & Zhao, Y. (2012). Effects of pharmaceutical medications on male fertility. *Journal of Reproduction & Infertility*, *13*, 3–11.
- Busardó, F. P., Gulino, M., Napoletano, S., Zaami, S., & Frati, P. (2014). The evolution of legislation in the field of medically assisted reproduction and embryo stem cell research in European Union members. *BioMed Research International*, *2014*, 307160. <https://doi.org/10.1155/2014/307160>
- Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W., Behre, H. M., ... Vogelsong, K. M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, *16*, 231–245. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048>
- Coughlan, C., Clarke, H., Cutting, R., Saxton, J., Waite, S., Ledger, W., ... Pacey, A. A. (2015). Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Asian Journal of Andrology*, *17*, 681–685.
- Fraczek, M., Szumala-Kakol, A., Dworacki, G., Sanocka, D., & Kurpisz, M. (2013). In vitro reconstruction of inflammatory reaction in human semen: Effect on sperm DNA fragmentation. *Journal of Reproductive Immunology*, *100*, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.09.005>
- Gosálvez, J., Cortés-Gutiérrez, E., López-Fernández, C., Fernández, J. L., Caballero, P., & Nuñez, R. (2009). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertility and Sterility*, *92*, 170–173. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.068>
- Gosálvez, J., Cortés-Gutiérrez, E. I., Nuñez, R., Fernández, J. L., Caballero, P., López-Fernández, C., & Holt, W. V. (2009). A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertility and Sterility*, *92*, 1915–1919. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.136>
- Gosálvez, J., García-Ochoa, C., Ruiz-Jorro, M., Martínez-Moya, M., Sánchez-Martín, P., & Caballero, P. (2013). ¿A qué velocidad "muere" el ácido desoxirribonucleico del espermatozoide tras descongelar muestras seminales procedentes de donantes? *Revista Internacional de Andrología*, *11*, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.androl.2013.02.005>
- Gosálvez, J., López-Fernández, C., Hermoso, A., Fernández, J. L., & Kjelland, M. E. (2014). Sperm DNA fragmentation in zebrafish (*Danio rerio*) and its impact on fertility and embryo viability - Implications for fisheries and aquaculture. *Aquaculture*, *433*, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.036>
- Gosálvez, J., Johnston, S., López-Fernández, C., Gosálbez, A., Arroyo, F., Fernández, J. L., & Álvarez, J. G. (2014a). Sperm fractions obtained following density gradient centrifugation in human ejaculates show differences in sperm DNA longevity. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, *3*, 116–120.
- Gosálvez, J., Nuñez, R., Fernández, J. L., López-Fernández, C., & Caballero, P. (2011). Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. *Andrologia*, *43*, 373–377. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01022.x>
- Grünwald, S., Fitzl, G., & Springsguth, C. (2017). Induction of ultra-morphological features of apoptosis in mature and immature sperm. *Asian Journal of Andrology*, *19*, 533–537. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.180974>
- Guijarro, M., Rocafort, E., Medrano, L., Leza, A., Ramos, B., Fernandez, M., & Aizpurua, J. (2015). Influence of sperm protamine gene expression (p1:p2 ratio) measured by FertiCert™ in assisted reproductive outcome. *Fertility and Sterility*, *104*, e67–e68. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.205>
- Hosen, B., Islam, R., Begum, F., Kabir, Y., & Howlader, Z. H. (2015). Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, *13*, 525–532.
- Hu, L., Liao, A. H., Song, S., Xiao, N., Xiang, W. P., & Xiong, C. L. (2012). Evaluation of donor semen quality provided by six sperm banks: A retrospective study of 1877 artificial insemination cycles. *Andrologia*, *44*, 499–504. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01215.x>
- Jin, J., Pan, C., Fei, Q., Ni, W., Yang, X., Zhang, L., & Huang, X. (2015). Effect of sperm DNA fragmentation on the clinical outcomes for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in women with different ovarian reserves. *Fertility and Sterility*, *103*, 910–916. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.01.014>
- Johnston, S. D., López-Fernández, C., Arroyo, F., Gosálbez, A., Cortés Gutiérrez, E. I., Fernández, J. L., & Gosálvez, J. (2016). Reduced sperm DNA longevity is associated with an increased incidence of still born; evidence from a multi-ovulating sequential artificial insemination animal model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *33*, 1231–1238. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0754-9>
- Kumar, S. B., Chawla, B., Bisht, S., Yadav, R. K., & Dada, R. (2015). Tobacco use increases oxidative DNA damage in sperm - possible etiology of childhood cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *16*, 6967–6972. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.16.6967>
- Li, W., Wu, J., Kim, S. Y., Zhao, M., Hearn, S. A., Zhang, M. Q., ... Mills, A. A. (2014). Chd5 orchestrates chromatin remodelling during sperm development. *Nature Communications*, *5*, 3812.
- López-Fernández, C., Johnston, S. D., Fernández, J. L., Wilson, R. J., & Gosálvez, J. (2010). Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm concentration. *Theriogenology*, *74*, 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.006>
- Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Alvarez, J. G., & Fernandez, J. L. (2007). Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *Journal of Andrology*, *28*, 38–49.
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, *12*, 417–435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
- Rao, M., Zhao, X. L., Yang, J., Hu, S. F., Lei, H., Xia, W., & Zhu, C. H. (2015). Effect of transient scrotal hyperthermia on sperm parameters, seminal plasma biochemical markers, and oxidative stress in men. *Asian Journal of Andrology*, *17*, 668–675.
- Rybar, R., Markova, P., Veznik, Z., Faldikova, L., Kunetkova, M., Zajcova, A., ... Rubes, J. (2009). Sperm chromatin integrity in young men with no experiences of infertility and men from idiopathic infertility couples. *Andrologia*, *41*, 141–149. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2008.00905.x>
- Santiso, R., Tamayo, M., Gosálvez, J., Johnston, S., Mariño, A., Fernández, C., ... Fernández, J. L. (2012). DNA fragmentation dynamics allows the assessment of cryptic sperm damage in human: Evaluation of exposure to ionizing radiation, hyperthermia, acidic pH and nitric oxide. *Mutation Research*, *734*, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.03.006>
- Simon, L., Murphy, K., Shamsi, M. B., Liu, L., Emery, B., Aston, K. I., ... Carrell, D. T. (2014). Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction*, *29*, 2402–2412. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu228>
- Speirs, J. (2011). Anonymous semen donation: Medical treatment or medical kinship? *Cargo Journal*, *11*, 73–90.
- Taha, E. A., Ez-Aldin, A. M., Sayed, S. K., Ghandour, N. M., & Mostafa, T. (2012). Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology*, *80*, 822–825. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2012.07.002>
- Wright, C., Milne, S., & Leeson, H. (2014). Sperm DNA damage caused by oxidative stress: Modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in

male infertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 28, 684–703. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.004>

Yelumalai, S., Kashir, J., Jones, C., Bagheri, H., Oo, S. L., McLaren, L., & Coward, K. (2012). Clinician-induced (iatrogenic) damage incurred during human infertility treatment: Detrimental effects of sperm selection methods and cryopreservation upon the viability, DNA integrity, and function of human sperm. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 1, 69–75. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60052-4)

Young, K. E., Robbins, W. A., Xun, L., Elashoff, D., Rothmann, S. A., & Perreault, S. D. (2003). Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: An investigation of remote semen collection conditions. *Journal*

*of Andrology*, 24, 853–861. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb03136.x>

**How to cite this article:** Tvrdá E, López-Fernández C, Sánchez-Martín P, Gosálvez J. Sperm DNA fragmentation in donors and normozoospermic patients attending for a first spermiogram: Static and dynamic assessment. *Andrologia*. 2018;e12986. <https://doi.org/10.1111/and.12986>