



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Estudio de las roturas de cadena sencilla y de cadena doble en el ADN de espermatozoides microseleccionados y su efecto en ciclos de ICSI

Sandra Lara Cerrillo

Memoria presentada para optar al Grado de Doctora en Biología Celular

por la Universidad Autónoma de Barcelona

Tesis doctoral inscrita en el Programa de Doctorado del Departamento de Biología

Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Medicina

Directores: Dr. Agustín García Peiró y Dr. Jordi Ribas-Maynou

Tutor: Dr. Jordi Benet Català

Bellaterra, octubre 2021

El **Dr. Agustín García Peiró**, director de CIMAB (Centre d'Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona), como director de la tesis,

el **Dr. Jordi Ribas Maynou**, investigador en el centro CIMAB hasta 2018, como director de la tesis,

y el **Dr. Jordi Benet Català**, profesor catedrático de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), como tutor de la tesis,

CERTIFICAN

Que **Sandra Lara Cerrillo** ha realizado bajo su dirección en el centro CIMAB y bajo su tutoría en la Unidad de Biología Celular y Genética Médica de la UAB el trabajo de investigación con título **“Estudio de las roturas de cadena sencilla y de cadena doble en el ADN de espermatozoides microseleccionados y su efecto en ciclos de ICSI”** para optar al título de Doctora.

Y para que así conste, firman el presente documento:

Agustín García Peiró

Jordi Ribas Maynou

Jordi Benet Català

Bellaterra, octubre de 2021

El presente trabajo de Tesis se ha desarrollado en el marco de un **Doctorado Industrial** financiado por la empresa **CIMAB S.L.** y con soporte económico de la “**Ayuda para la formación de doctores en empresas**” otorgada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y la Agencia Estatal de Investigación del Gobierno de España (Ref.: DI-16-08429).

Agradecimientos

Llegado el momento de poner punto final a esta etapa, me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible, de una forma u otra, que hoy presente esta Tesis Doctoral.

En primer y destacado lugar, al Dr. Agustín García, por abrirme las puertas de CIMAB y por confiar en mí para éste y otros tantos proyectos. Tu profesionalidad, tenacidad e instinto científico son una inspiración. Seguimos avanzando.

Al Dr. Jordi Ribas por guiarme en los primeros años de esta andadura. Al Dr. Jordi Benet, que merecidamente se jubila, por tu seguimiento y por sentar unas bases sólidas donde se han podido cimentar ésta y otras muchas Tesis.

A mis “Chicas del lab”, Tania, Candela y Laura, por vuestra incansable ayuda y por los buenos momentos en el día a día. A Verónica, por escucharme, por tus consejos y por tener siempre palabras amables de apoyo. A todas vosotras, teneros al lado ha marcado la diferencia.

A Sergio, compañero doctorando, por compartir estos años de estrés y avances, aunque en la distancia.

También quiero acordarme de aquellas personas que me han acompañado fuera del laboratorio. Por vuestro entusiasmo cuando todo ha ido bien y por vuestro apoyo cuando ha habido algún tropiezo.

A los “SenseNom”, encontrar personas con mi misma pasión fue un gran regalo. A vuestro lado disfruté la Biotec, y mucho más lo que no era Biotec. Que sigamos pasando buenos ratos.

A mis amigas de siempre Ainhoa, Alba, Ana María, Bárbara, Iris, Mari, Patricia, Sandra. Sois mi gran apoyo. Incluso cuando no me entendéis, me entendéis.

Pero si he llegado hasta este momento es, sobre todo, gracias a mi familia.

En primer lugar, a mis cuatro abuelos, Paco, Matilde, Manolo y Cati. Nos habéis enseñado con gran maestría que la vida no es más que bondad y esfuerzo. Y al resto de mi gran gran familia, por preservar estos valores y animarme siempre en todos los proyectos.

Especialmente a Edu, por tu cariño y tu apoyo a todos los niveles, todos los días. A tu lado, todo lo que nos traiga la vida, valdrá la pena. Y a la familia Abella Curiel, por incluirme, quererme y por estar ahí siempre.

Y, por último, y más importante, a mis padres y mi hermano, Manuel, Araceli y Javi. Por vuestro apoyo y amor incondicional, por creer siempre en mí y por dedicarme los mayores esfuerzos y los mejores momentos de vuestras vidas.

A todos vosotros, gracias por darle significado a estos cinco años.

Sandra Lara Cerrillo

Octubre de 2021

A Manuel y Araceli.

“Y conserva tus sueños, nunca sabes cuándo te van a hacer falta”.

Carlos Ruiz Zafón

Índice de contenido

LISTA DE TABLAS	14
LISTA DE FIGURAS	16
RESUMEN	17
SUMMARY	20
ABREVIACIONES	23
1. INTRODUCCIÓN	27
1.1. REPRODUCCIÓN HUMANA	29
1.1.1. ORGANIZACIÓN EL GENOMA HUMANO	29
1.1.2. MITOSIS Y MEIOSIS	30
1.1.3. GAMETOGÉNESIS	31
1.1.3.1. Gametogénesis masculina	31
1.1.3.2. Gametogénesis femenina	36
1.2. INFERTILIDAD HUMANA	38
1.2.1. DESCRIPCIÓN E INCIDENCIA	38
1.2.2. INFERTILIDAD MASCULINA	39
1.2.2.1. Declive de la fertilidad en relación a la edad del varón	39
1.2.2.2. Infertilidad adquirida	40
1.2.3. INFERTILIDAD FEMENINA	42
1.2.3.1. Declive de la fertilidad en relación con la edad de la mujer	42
1.2.3.2. Infertilidad adquirida	43
1.3. ADN ESPERMÁTICO	44
1.3.1. ADN ESPERMÁTICO MITOCONDRIAL	44
1.3.2. ADN ESPERMÁTICO NUCLEAR	45
1.3.2.1. Nivel de condensación	45
1.3.2.2. Organización de la cromatina y del núcleo espermático	46
1.3.2.3. Tipos de daño en el ADN espermático	48
1.3.3. FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	48

1.3.3.1. Roturas de cadena sencilla _____	48
1.3.3.2. Roturas de cadena doble _____	49
1.3.3.3. Origen de las roturas en el ADN espermático _____	51
1.3.4. FRAGMENTACIÓN DEL ADN Y SU EFECTO SOBRE LA FERTILIDAD _____	55
1.3.4.1. Fragmentación de cadena sencilla y fertilidad _____	56
1.3.4.2. Fragmentación de cadena doble y fertilidad _____	56
1.4. EVALUACIÓN DE LA INFERTILIDAD MASCULINA _____	57
1.4.1. EVALUACIÓN BÁSICA _____	57
1.4.1.1. Revisión del historial médico _____	58
1.4.1.2. Exploración física y ecográfica _____	58
1.4.1.3. Evaluación hormonal _____	58
1.4.1.4. Seminograma _____	58
1.4.2. DETECCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO _____	59
1.4.2.1. Naranja de acridina y Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) _____	60
1.4.2.2. Comet Assay _____	60
1.4.2.3. TUNEL _____	63
1.4.2.4. Test de dispersión de la cromatina _____	64
1.4.3. COMPARACIÓN ENTRE TÉCNICAS _____	64
1.5. TRATAMIENTOS PARA LA INFERTILIDAD DEL VARÓN _____	65
1.5.1. TRATAMIENTOS FISIOLÓGICOS _____	65
1.5.2. TRATAMIENTOS SOBRE LA MUESTRA SEMINAL EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA _____	66
1.5.2.1. Selección espermática basada en la movilidad _____	66
1.5.2.2. Otros sistemas de selección espermática _____	67
1.5.3. TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA _____	68
1.5.3.1. Inseminación artificial _____	69
1.5.3.2. Fecundación in vitro convencional _____	69
1.5.3.3. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides _____	70
1.5.4. TEST GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL _____	71
1.5.5. DONACIÓN DE GAMETOS O EMBRIONES _____	71
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS _____	75
2.1. HIPÓTESIS _____	77
2.2. OBJETIVOS _____	78

3. MATERIALES Y MÉTODOS	81
3.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SEMEN	83
3.1.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS, CONSENTIMIENTO INFORMADO Y COMITÉ DE ÉTICA	83
3.1.2. GRUPOS DE PACIENTES	83
3.1.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	85
3.1.4. ANÁLISIS DE SEMINOGRAMA	85
3.2. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA SEMINAL	86
3.2.1. SWIM-UP	86
3.2.2. GRADIENTES DE DENSIDAD	86
3.2.3. SELECCIÓN MICROFLUÍDICA (ZYMÖT™ICSI)	87
3.3. SELECCIÓN ESPERMÁTICA PARA ICSI	87
3.4. DETERMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	88
3.4.1. METODOLOGÍAS SOBRE LA MUESTRA SEMINAL	89
3.4.1.1. Comet assay	89
3.4.1.2. Test de dispersión de la cromatina	90
3.4.1.3. TUNEL assay	91
3.4.2. ADAPTACIONES PARA EL ESTUDIO DE ESPERMATOZOIDES SELECCIONADOS	92
3.4.2.1. Adaptaciones para fijaciones en matriz de agarosa	92
3.4.2.2. Adaptaciones para fijaciones en Carnoy	93
3.5. TRATAMIENTOS DE ICSI	94
3.5.1. ESTIMULACIÓN OVÁRICA Y OBTENCIÓN DE LOS OVOCITOS	94
3.5.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE EYACULADO	94
3.5.3. FECUNDACIÓN Y CULTIVO DE EMBRIONES	94
3.5.4. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL	95
3.5.5. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA Y RESULTADOS CLÍNICOS	95
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	95
4. RESULTADOS	99
4.1. PROYECTO 1	101
4.1.1. PROYECTO 1.1: ADAPTACIONES PARA EL ESTUDIO DE ESPERMATOZOIDES SELECCIONADOS	101
4.1.1.1. Adaptaciones para fijaciones en agarosa	101
4.1.1.2. Adaptaciones para fijaciones en Carnoy	103
4.1.1.3. Eficiencias de las adaptaciones	103

4.1.2. PROYECTO 1.2: ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN MUESTRAS DE EYACULADO, SWIM-UP E ICSI-S	105
4.1.3. PROYECTO 1.3: ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO SOBRE ESPERMATOZOIDES ICSI-N	116
4.2. PROYECTO 2	119
4.3. PROYECTO 3	136
5. DISCUSIÓN	157
5.1. LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO PUEDEN ADAPTARSE PARA EL ESTUDIO DE ESPERMATOZOIDES MICROSELECCIONADOS	160
5.2. LA EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN EN EL EYACULADO NO ES REPRESENTATIVA DE LOS ESPERMATOZOIDES SELECCIONADOS EN CICLOS DE ICSI	162
5.3. LOS ESPERMATOZOIDES CON MORFOLOGÍA O MOVILIDAD ALTERADAS PRESENTAN VALORES INCREMENTADOS DE SSB Y DSB	165
5.4. EN CICLOS DE ICSI, LAS ROTURAS DEL TIPO SSB AFECTAN A LA TASA DE FECUNDACIÓN, MIENTRAS QUE LAS ROTURAS DEL TIPO DSB AFECTAN A LA TASA DE EUPLOIDÍA	168
5.5. LAS TASAS DE FECUNDACIÓN Y EUPLOIDÍA EN CICLOS DE ICSI MEJORAN TRAS EL USO DE UN DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO	171
5.6. LOS RESULTADOS CLÍNICOS EN CICLOS DE ICSI MEJORAN TRAS EL USO DE UN DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO CUANDO LOS VARONES PRESENTAN NIVELES ELEVADOS DE DSB	174
5.7. MANEJO DE PACIENTES CON FRAGMENTACIÓN EN EL ADN ESPERMÁTICO	175
5.8. PERSPECTIVAS DE FUTURO	176
5.8.1. UTILIDAD DEL DIAGNÓSTICO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	176
5.8.2. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	177
6. CONCLUSIONES	181
7. BIBLIOGRAFÍA	187
8. ANEXOS	203
8.1. ANEXO 4: MODELOS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	205
8.1.1. CONSENTIMIENTO INFORMADO EN EL CENTRO CIMAB	205
8.1.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO EN EL CENTRO UEG	206
8.1.3. CONSENTIMIENTO INFORMADO EN EL CENTRO GINEFIV	214

Lista de tablas

Número de tabla	Página	Descripción
1	43	Incidencia de las alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos.
2	86	Valores de referencia para los distintos parámetros seminales.
3	101	Adaptaciones testadas para la fijación de espermatozoides microseleccionados en una matriz de agarosa.
4	102	Ejemplos de las adaptaciones testadas para la fijación de espermatozoides microseleccionados.
5	103	Adaptaciones testadas para la fijación de espermatozoides microseleccionados con solución de Carnoy.
6	117	Resultados de fragmentación de cadena doble y cadena sencilla en las muestras de eyaculado, Swim-up, ICIS-S e ICSI-N con diferentes alteraciones.

Lista de figuras

Número de figura	Página	Descripción
1	29	Organización del ADN, la cromatina y los cromosomas.
2	30	Procesos de mitosis y meiosis humana †. Adaptada del modelo “Meiosis-Sperm” y “Meiosis-Oocyte” en BioRender.com (2021).
3	32	Estructura del testículo humano.
4	34	Etapas de la gametogénesis masculina †.
5	35	Imagen de microscopía electrónica de barrido de un espermatozoide y representación de su estructura †. Adaptada del modelo “Meiosis (14. Sperm)” en BioRender.com (2021)
6	37	Gráfico del número de células germinales contenidas en los ovarios de una mujer.
7	39	Etiología de la infertilidad según su origen.
8	47	Modelo de los elementos estructurales en la cromatina espermática.
9	47	Arquitectura del núcleo espermático según el modelo de Zalensky.
10	48	Tipos de daño en el ADN.
11	50	Tipos de roturas en el ADN de los espermatozoides.
12	51	Mecanismos que pueden inducir daño en el ADN durante la producción de los espermatozoides y durante su transporte.
13	53	Papel de las especies reactivas de oxígeno en la fertilidad masculina.
14	55	Pronúcleos maternos y paternos en embriones de ratón.
15	60	Cambio de fluorescencia del Naranja de acridina.
16	62	Detección de roturas de cadena sencilla y de cadena doble en el ADN espermático tras la realización de la técnica Comet a pH alcalino y neutro.
17	62	Imágenes de núcleos espermáticos tras realizar el test Comet alcalino y Comet neutro para la detección de roturas de cadena sencilla y de cadena doble, respectivamente.
18	63	Imagen de espermatozoides tras la realización del test TUNEL.
19	64	Imágenes de núcleos espermáticos tras el test de dispersión de la cromatina.
20	68	Métodos de selección espermática: Swim-up; Gradientes de densidad y sistema microfluídico ZyMöt™ICSI †.
21	88	Placa de ICSI utilizada para la microselección de espermatozoides †.
22	118	Valores de fragmentación de cadena sencilla en muestras de eyaculado, tras un Swim-up, espermatozoides seleccionados para (ICSI-S) y espermatozoides descartados para ICSI (ICSI-N) con diferentes alteraciones.
23	118	Valores de fragmentación de cadena doble en muestras de eyaculado, tras un Swim-up, espermatozoides seleccionados para (ICSI-S) y espermatozoides descartados para ICSI (ICSI-N) con diferentes alteraciones.
24	176	Pronóstico y posible tratamiento efectivo en pacientes infértiles tras la determinación de los niveles de fragmentación del ADN espermático de cadena sencilla y de cadena doble mediante el test Comet.

† Figura creada en BioRender.com

Resumen

El estudio de la fragmentación del ADN espermático para la evaluación de varones infértiles ha sido de gran interés en los últimos años. Este daño puede ser de cadena sencilla (SSB), mayoritariamente debido a la presencia de estrés oxidativo y relacionado con la capacidad de conseguir un embarazo y la tasa de fecundación; o de cadena doble (DSB), con un origen mayoritariamente enzimático y relacionado con una cinética embrionaria lenta, una menor tasa de implantación y un riesgo elevado de aborto. La fragmentación en el ADN de los espermatozoides se puede estudiar mediante diferentes técnicas como el test Comet (versiones alcalina y neutra), el test de dispersión de la cromatina o el test TUNEL.

Existen numerosos estudios que relacionan la presencia de roturas en el ADN de los espermatozoides con dificultades para concebir. No obstante, la última revisión emitida por un organismo especializado concluye que no hay suficiente evidencia como para recomendar su análisis de rutina antes de realizar ciclos de reproducción asistida. El primer objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido encontrar una posible explicación a la falta de asociación entre los valores de fragmentación y los resultados reproductivos en tratamientos de Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Para ello, se ha realizado un estudio multimetodológico de la fragmentación con protocolos adaptados para el estudio de espermatozoides microseleccionados bajo criterios de ICSI (ICSI-S). También se han estudiado espermatozoides descartables para ICSI por presentar alteraciones en su movilidad o morfología (ICSI-N).

Los resultados muestran la existencia de un sesgo diagnóstico al analizar los valores de SSB y DSB en la muestra de eyaculado en comparación con la subpoblación de espermatozoides candidatos para ICSI. Mientras que los valores de SSB se reducen significativamente en los ICSI-

Si en comparación con el eyaculado y la muestra tras realizar un Swim-up, los valores de DSB se mantienen en el mismo nivel. Estos resultados indican que el proceso de preparación seminal y el proceso de selección espermática en ICSI no permiten seleccionar espermatozoides libres de DSB, pero sí de SSB. Por su parte, los espermatozoides ICSI-N muestran valores incrementados de SSB y DSB, posiblemente relacionado con la presencia de un nivel elevado de estrés oxidativo y de apoptosis abortiva.

Tras determinar que los valores de DSB encontrados en el eyaculado no se pueden disminuir mediante la selección de espermatozoides móviles, el segundo objetivo ha sido estudiar el efecto de estas roturas en ciclos de ICSI. Se han comparado las tasas de fecundación y euploidía tras el uso de un método convencional de preparación seminal (Gradientes de densidad) y tras el uso de un nuevo método de selección microfluídico (dispositivo ZyMōt™ICSI). Previamente, el método convencional ha mostrado una reducción eficiente de los valores de SSB, pero no de DSB. Por el contrario, el dispositivo microfluídico sí ha mostrado resultados prometedores para reducir significativamente los niveles de ambos tipos de roturas. Los resultados muestran que el uso del dispositivo microfluídico permite aumentar la tasa de fecundación en comparación a los Gradientes de densidad, posiblemente debido a la mayor reducción en los valores de SSB. El dispositivo microfluídico también ha permitido aumentar la tasa de euploidía de los embriones obtenidos, especialmente cuando la pareja femenina es menor de 35 años en comparación con el uso del sistema convencional, posiblemente debido a la reducción de los valores de DSB. En mujeres mayores de 35 años, también se observa un aumento de la tasa de euploidía, aunque pueden persistir las alteraciones relacionadas con la edad materna.

En cuanto al segundo objetivo, también se ha sido estudiado el efecto clínico del sistema de selección microfluídico cuando los pacientes presentan valores alterados de DSB. Los resultados

muestran que el uso del dispositivo ZyMōt™ICSI permite obtener mejores tasas de embarazo bioquímico y embarazo clínico y una menor tasa de aborto en comparación con métodos convencionales.

En vista de los resultados obtenidos, en la presente Tesis Doctoral se concluye que: **i)** existe un sesgo diagnóstico al estudiar la fragmentación del ADN espermático en muestras de eyaculado ya que la selección de espermatozoides móviles conlleva una reducción significativa de los valores de SSB pero no de los valores de DSB, evidenciando la necesidad de diferenciar entre ambos tipos de rotura para encontrar una asociación entre los valores de fragmentación y los resultados reproductivos en ICSI; **ii)** los espermatozoides descartados para ICSI presentan niveles elevados de SSB y DSB, evidenciando la necesidad de escoger espermatozoides con movilidad óptima y sin alteraciones morfológicas para su uso en ICSI; **iii)** el dispositivo microfluídico ZyMōt™ICSI permite obtener mejores tasas de fecundación en comparación a los Gradientes de densidad, posiblemente relacionado con la reducción de SSB y **iv)** el dispositivo microfluídico ZyMōt™ICSI permite obtener mejores tasas de euploidía, embarazo bioquímico y embarazo clínico y una menor tasa de aborto, posiblemente relacionado con la reducción específica de DSB en comparación con el uso de métodos convencionales basados en la movilidad de los espermatozoides que no permiten reducir estos valores.

Summary

The study of sperm DNA fragmentation to evaluate infertile men has been an emerging field during the last years. DNA breaks can affect one or both strands, resulting in Single-Strand Breaks (SSB) or Double-Strand Breaks (DSB). SSB in sperm DNA have an oxidative origin and showed to reduce the chances of achieving a natural pregnancy. DSB have an enzymatic origin and showed to reduce embryo's kinetics, implantation rates and to increase the miscarriage risk. DNA breaks can be studied using different techniques such as the Comet assay (alkaline and neutral versions), the Sperm chromatin dispersion test or the TUNEL test.

Numerous studies show a relationship between DNA breaks in sperm and male infertility. However, the last review published by a specialized organization concluded that there is not enough evidence to recommend routine DNA damage testing before assisted reproduction treatments, especially Intracytoplasmic Sperm Injection treatments (ICSI). The main objective of this Doctoral Thesis was to provide a possible explanation for this discrepancy. For this purpose, DNA breaks were studied on microselected sperm candidates for ICSI (ICSI-S). Sperm presenting motility or morphological alterations were also studied (ICSI-N).

The results revealed a diagnostic bias when SSB and DSB are measured on the ejaculate sample compared to those values found on ICSI-S. SSB were significantly reduced after semen preparation through a Swim-up procedure and after ICSI selection compared to the ejaculate. On the contrary, DSB were present in sperm after the Swim-up and after ICSI sperm selection in the same proportion than in the ejaculate sample. On the other hand, ICSI-N sperm showed significantly increased values of SSB and DSB compared to the ejaculate, the Swim-up sample

and ICSI-S, probably related to high oxidative stress conditions and to the abortive apoptosis process.

After showing that conventional methods based on sperm motility may reduce SSB values but do not affect DSB, the second objective of the present Doctoral Thesis was to study the effect of these breaks on reproductive outcomes after ICSI. Fertilization and euploidy rates were compared after using a conventional method for semen preparation (Density gradients) and using a novel microfluidic sperm sorting device (ZyMöt™ICSI). The conventional method has previously shown to reduce SSB values, but not DSB values. On the contrary, the microfluidic device has recently shown to reduce both types of damage. The use of the microfluidic device resulted in better fertilization rates compared to the use of Density gradients. These results might be attributed to a better reduction in SSB values after using the ZyMöt™ICSI. The use of this device also increased the euploidy rate of the obtained embryos after ICSI, especially when the female partner was under 35 years of age. This increase might be attributed to the reduction in DSB values. The use of the microfluidic device also increased the euploidy rate when women were older than 35 years, but the presence of aneuploidies related to women's age persisted.

In addition to the second objective, the effect of the microfluidic sorting device on clinical outcomes after ICSI was studied. The use of this device when patients presented high DSB values resulted in better biochemical and clinical pregnancy rates and lower miscarriage rates compared to conventional methods.

In view of the obtained results, in the present Doctoral Thesis it is concluded that: **i)** there is a diagnostic bias when sperm DNA fragmentation is studied on ejaculate samples because the selection of a motile sperm reduces the chances of presenting SSB while does not affect DSB values, fact that highlights the need to discriminate both types of breaks to find a relationship

between DNA fragmentation values and reproductive outcomes; **ii)** sperm presenting motility or morphological alterations show high values of SSB and DSB, fact that highlights the need to select a sperm with optimal parameters for ICSI treatments; **iii)** the use of the ZyMöt™ICSI microfluidic device allows to obtain better fertilization rates compared to the use of conventional methods, maybe related to the reduction in SSB values and **iv)** the use of the ZyMöt™ICSI microfluidic device allows to increase euploidy, biochemical pregnancy and clinical pregnancy rates and reduce the miscarriage risk, maybe related to the reduction in DSB values, compared to the use of conventional methods based on sperm motility that would not reduce these values.

Abreviaciones

- **8-OHdG** 8-OH-2' desoxiguanosina
- **ADN** Ácido desoxirribonucleico
- **AO** *Acridine Orange* - Naranja de acridina
- **ASRM** *American Society for Reproductive Medicine* - Sociedad americana sobre medicina reproductiva
- **ATM** *Ataxia-Telangiectasia-Mutated* - Ataxia telangiectasia mutado
- **ATR** *ATM- and Rad3-Related* - Proteína relacionada con ATM y Rad3
- **AZF** *Azoospermia Factor* - Factor de azoospermia
- **BER** *Base Excision Repair* - Reparación por escisión de bases
- **CFTR** *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* - Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
- **DAPI** *4,6-diamidino-2-phenylindole* - 4',6-diamidino-2-fenilindol
- **DSB** *Double-Strand Break* - Rotura de cadena doble
- **DTT** Ditionitrosol
- **dUTP** *Deoxyuridine Triphosphate* - Trifosfato de desoxiuridina
- **EDTA** *Ethylenediaminetetraacetic acid* - Ácido etilendiaminotetraacético
- **FasL** Fas-Ligando
- **FISH** *Fluorescent In Situ Hybridization* - Hibridación *in situ* fluorescente
- **FIV** Fecundación *In Vitro*
- **FSH** *Follicle-Stimulating Hormone* - Hormona estimulante de folículos
- **HDS** *High DNA Stainability* - Elevada tinción del ADN
- **IA** Inseminación artificial
- **ICSI** *Intracitoplasmic Sperm Injection* - Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
- **ICSI-N** Espermatozoides negativos/descartados para ICSI
- **ICSI-S** Espermatozoides seleccionados para ICSI
- **Kb** Kilobases
- **LH** *Luteinizing Hormone* - Hormona luteinizante
- **MACS** *Magnetic Activated Cell Sorting* - Selección magnética de células activadas
- **MAR** *Matrix Attachment Regions* - Regiones de unión a la matriz nuclear
- **NHEJ** *Non-Homologous End Joining* - Unión de extremos no homólogos
- **OMS** Organización Mundial de la Salud
- **PGC** *Primordial Germ Cells* - Células germinales primordiales
- **PGT** *Preimplantational Genetic Testing* - Diagnóstico genético preimplantacional
- **PVP** Polivinilpirrolidón

- **ROS** *Reactive Oxygen Species* - Especies reactivas de oxígeno
- **SCD** *Sperm Chromatin Dispersion* - Dispersión de la cromatina espermática
- **SCGE** *Single-Cell Gel Electrophoresis* - Electroforesis en gel de célula única
- **SCSA** *Sperm Chromatin Structure Assay* - Ensayo sobre la estructura de la cromatina espermática
- **SDS** *Sodium Dodecyl Sulfate* - Dodecil sulfato de sodio
- **Sry** *Sex-determining region of Y* - Región de determinación sexual del cromosoma Y
- **SSB** *Single-Strand Break* - Rotura de cadena sencilla
- **TdT** *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* - Desoxinucleotidil transferasa terminal
- **TESE** *Testicular Sperm Extraction* - Extracción de espermatozoides testiculares
- **TRA** Tratamientos de Reproducción Asistida
- **TUNEL** *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling* – Marcado final de corte de dUTP con la Terminal deoxinucleotidil transferasa
- **βHCG** *β-Human Chorionic Gonadotropin* - Gonadotropina coriónica humana

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Reproducción humana

1.1.1. Organización el genoma humano

Los organismos eucariotas pluricelulares, como los humanos, guardan su información genética en forma de cadenas de **ácido desoxirribonucleico (ADN)**. Éste se encuentra empaquetado dentro del núcleo de cada célula en fracciones llamadas cromosomas que, según la etapa del ciclo celular tienen una o dos cromátidas idénticas (Figura 1).

La especie humana se caracteriza por tener 46 cromosomas en sus células somáticas (aquellas que forman tejidos y órganos). Cada célula somática se considera **diploide** (dotación $2n$) ya que contiene dos copias de cada cromosoma del 1 al 22 (autosomas), y dos cromosomas sexuales (XX en mujeres y XY en hombres). Las dos copias de cada cromosoma se denominan homólogas. Por el contrario, las células germinales o gametos (aquellas células destinadas a la reproducción) son **haploides** (dotación n), ya que solamente contienen una copia de cada autosoma y un solo cromosoma sexual (en mujeres siempre es el X, mientras que en hombres puede ser el X o el Y) (1).

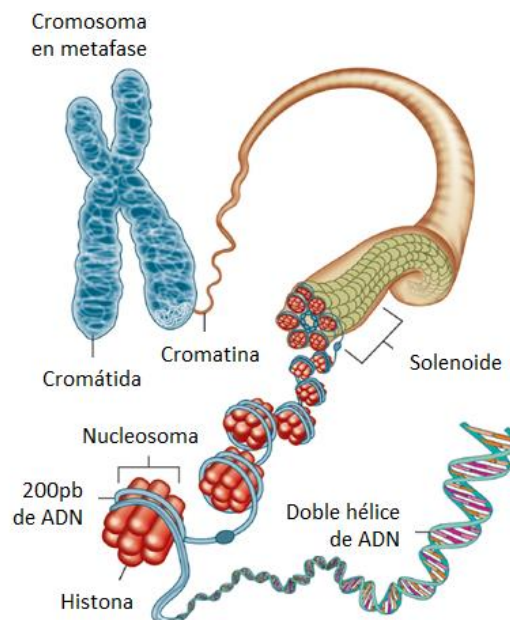


Figura 1. Esquema de la organización del ADN, la cromatina y los cromosomas. Traducida de Hamada y col., 2012 (2).

1.1.2. Mitosis y meiosis

La **reproducción humana** se basa en la fusión de dos gametos haploides, uno masculino y otro femenino, para dar lugar a un nuevo individuo diploide. Este nuevo individuo empieza con la formación de un cigoto que, mediante el proceso de **mitosis** (Figura 1), aumenta el número de células diploides que lo forman hasta generar un individuo completo (1).

El proceso de formación de las células germinales se denomina **meiosis** (1) (Figura 2). Este proceso parte de una célula madre diploide con 46 cromosomas y finaliza dando lugar a células haploides con 23 cromosomas. Existen diferencias en el proceso de meiosis masculina y femenina que dan lugar a gametos diferentes: espermatozoides y ovocitos, respectivamente.

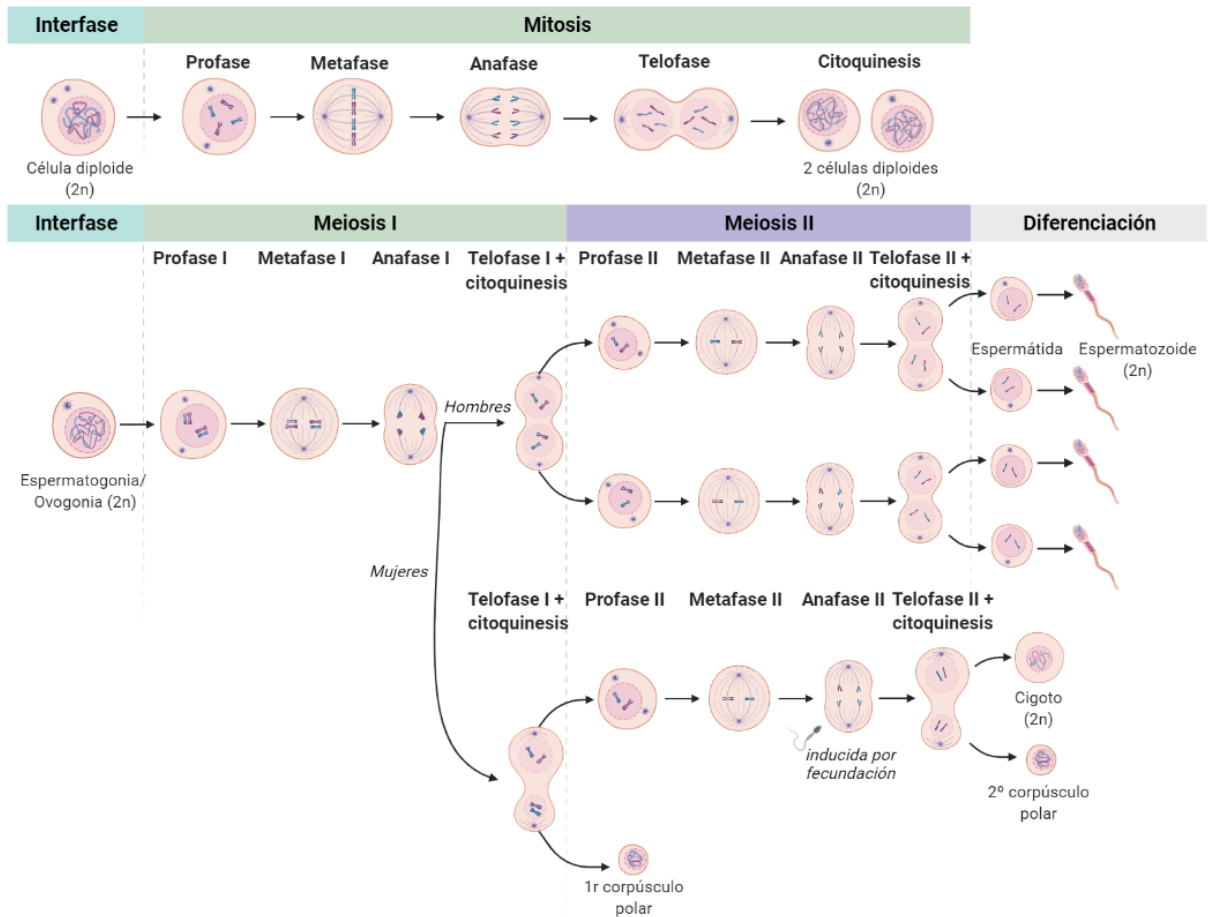


Figura 2. Esquema de los procesos de mitosis y meiosis humana [‡]. Adaptada del modelo “Meiosis-Sperm” y “Meiosis-Oocyte” en BioRender.com.

1.1.3. Gametogénesis

La **gametogénesis** es el proceso mediante el cual se generan los gametos masculinos y femeninos. El proceso se inicia en la etapa fetal de los individuos, una vez se ha producido la fecundación y se genera el **cigoto** (3). Esta primera célula del nuevo individuo inicia el proceso de mitosis para aumentar el número de células diploides que lo forman. En el momento en el que el nuevo organismo es pluricelular se denomina **embrión** y todas sus células son totipotentes ya que son capaces de generar todos los tipos de linajes celulares (3).

A partir del día +5 de desarrollo o post-concepción (p.c.), el embrión llega al estadio de **blastocisto**, en el que se pueden diferenciar dos tipos celulares: la masa celular interna y el trofotodermo. Sobre la semana +5 p.c., las **células germinales primordiales** (PGC, de sus siglas en inglés: *Primordial Germ Cells*) migran hacia la zona de las crestas genitales, las futuras gónadas del individuo (3). Las PGC son células madre indiferenciadas que han perdido su capacidad para generar tejidos somáticos y solo podrán derivar en gametos. Tras varias divisiones mitóticas para aumentar su número, las PGC generan espermatogonias u ovogonias, células progenitoras de espermatozoides y ovocitos, respectivamente (1,3).

1.1.3.1. Gametogénesis masculina

La **espermatogénesis** o gametogénesis masculina, a diferencia de la femenina, permite la producción constante de espermatozoides a lo largo de la vida adulta de los mamíferos euterios. En humanos, la producción diaria de espermatozoides varía entre 150 y 275 millones en varones sanos (4,5). Este proceso tiene lugar en las gónadas masculinas, los **testículos**, que se encuentran dentro del escroto y fuera de la cavidad corporal. Los testículos están divididos en 200-300 lóbulos formados por una estructura de **túbulos seminíferos** que se fusionan para formar el **epidídimo**. Éste continúa en el conducto deferente y desemboca en la uretra del pene (3,6) (Figura 3).

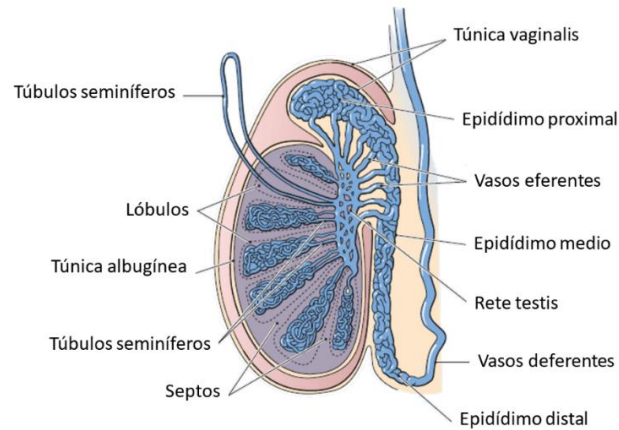


Figura 3. Representación de la estructura del testículo humano. Traducida de Johnson, 2007 (3).

Los túbulos seminíferos suponen el 60-70% de la masa testicular en el hombre adulto y en sus paredes se alojan las **espermatogonias** (7). En la misma estructura se encuentran las células de Sertoli que sustentan y nutren a las células germinales. Estas células regulan la espermatogénesis y llegan a ocupar el 17-20% del epitelio de los túbulos seminíferos. Además, entre los túbulos y los vasos sanguíneos de los testículos se encuentran las células de Leydig, que secretan testosterona (3). La secreción de esta hormona durante la etapa fetal induce a la diferenciación y el desarrollo gonadal masculino. La producción de testosterona se interrumpe tras el nacimiento y se reanuda en la pubertad dando lugar a las características sexuales secundarias (7). Además, en el aparato reproductor masculino se incluyen glándulas accesorias como la glándula prostática, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales que secretan la mayor parte del líquido seminal (3).

El proceso de producción de espermatozoides en humanos tiene una duración aproximada de 70 días (6) y consta de tres fases: i) **etapa de mitosis o proliferativa**, para la producción de un gran número de espermatogonias, ii) **etapa de meiosis o espermatogénesis**, para la producción final de espermátidas redondas haploides, y iii) **etapa post-meiótica o espermiogénesis**, en la que las espermátidas sufren modificaciones, como la reestructuración de la del empaquetamiento del ADN, para acabar dando lugar a espermatozoides.

Tras la formación de espermatozoides haploides ocurren dos etapas en la que éstos adquieren la competencia para fecundar: iv) **etapa de maduración** en el epidídimo y v) **etapa de capacitación** en el tracto reproductor femenino (4). A continuación, se detalla cada etapa.

Etapa de mitosis o proliferativa

Hasta la semana +5 p.c. la diferenciación sexual de un embrión es bipotencial (3). El desarrollo masculino viene determinado por la presencia del **gen Sry** (de sus siglas en inglés: *Sex-determining region of Y*) en el cromosoma Y de las células somáticas de la gónada que desencadena la producción de testosterona (1).

El proceso se inicia con la proliferación exponencial de PGC por mitosis durante la etapa fetal y se interrumpe al nacer. Entre el nacimiento y los 6 meses de vida, las PGC se diferencian en **espermatogonias** que quedan mitóticamente inactivas hasta la pubertad. En ese momento se hace posible su entrada en meiosis gracias al aumento de las hormonas gonadotróficas (4,7) (Figura 4).

La producción de espermatozoides es continua a partir de la pubertad ya que las espermatogonias tienen una actividad dual: mientras que algunas de ellas siguen el proceso de diferenciación por meiosis hasta formar espermatozoides, las demás siguen multiplicándose por mitosis a lo largo de toda la vida del varón. La decisión sobre la entrada en mitosis o meiosis parece estar relacionada con factores procedentes de las células de Sertoli (7).

Etapa de meiosis o espermatogénesis

Cuando una **espermatogonia** (diploide con una cromátida: $2n^1$) inicia el proceso de diferenciación, emplea unos 62-75 días pasando por los estadios de espermatocito primario (diploide con dos cromátidas: $2n^2$) y espermatocito secundario (haploide con dos cromátidas: n^2), hasta llegar a la forma de **espermátidas** (haploide con una cromátida: n^1) (Figura 4).

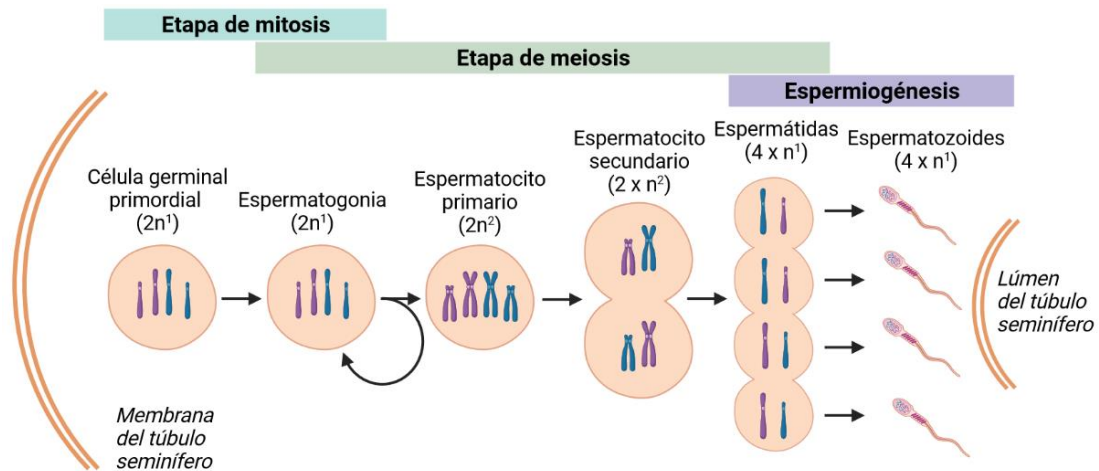


Figura 4. Representación de las etapas de la gametogénesis masculina [†].

Etapa post-meiótica o espermiogénesis

En esta fase los espermatozoides sufren diferentes cambios como la reorganización nuclear. En 1946, Pollister y Mirsky mostraron la primera evidencia de que el genoma espermático se encuentra empaquetado unido a protaminas y no histonas como las células somáticas (8). Posteriormente, se ha comprobado que en esta etapa se cambian las histonas por las proteínas de transición TP1 y TP2 y, finalmente, por las **protaminas P1 y P2**. Este proceso permite una **hipercondensación** del ADN espermático (4).

En esta fase se forma el flagelo, el acrosoma, se eliminan la mayoría de los orgánulos celulares y el citoplasma formando la gota citoplasmática. Además, se produce una gran cantidad de **mitocondrias**, orgánulos encargados de la producción de energía necesaria para el movimiento del flagelo o cola y que se sitúan en la **pieza intermedia** del espermatozoide (9) (Figura 5).

Las etapas de meiosis y post-meiosis tienen lugar en los túbulos seminíferos y se producen de forma sincrónica de un estadio al siguiente en una sección concreta del túbulo. Las células más inmaduras se encuentran en la parte periférica mientras que las células más diferenciadas se dirigen hacia el lumen. Los espermatozoides completamente formados se desprenden en el lumen y llegan al epidídimo, donde sucede la maduración espermática (4) (Figura 4).

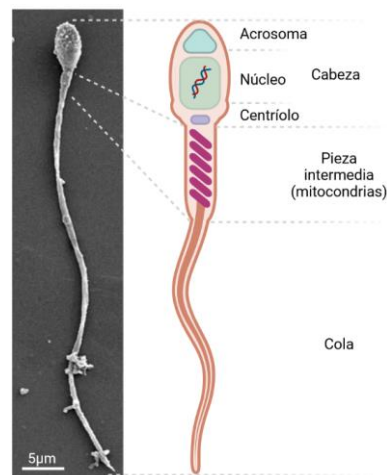


Figura 5. Imagen de microscopía electrónica de barrido de un espermatozoide y representación de su estructura. Imagen obtenida de Wu y col., 2020 [‡]. Adaptada del modelo “Meiosis (14. Sperm)” en BioRender.com.

Etapa de maduración espermática

La maduración de los espermatozoides tiene lugar durante su tránsito por el **epidídimo**, una estructura adyacente a los testículos dentro de la bolsa escrotal. El epidídimo se puede dividir en tres secciones funcionalmente diferentes (proximal, media y distal, según su proximidad al testículo) que no pueden diferenciarse fisiológicamente (Figura 3). Esta etapa tiene una duración aproximada de 11 días, aunque puede ser muy variable (3,4).

Durante la maduración espermática se desprende completamente la gota citoplasmática del espermatozoide y se dan cambios en la composición de la membrana celular, como la incorporación de proteínas que confieren la habilidad de unirse a la zona pelúcida del ovocito (fibronectinas lactosaminiglicanos, galactosiltransferasas, etc.). También se generan **puentes disulfuro** entre las protaminas que empaquetan el ADN espermático, de forma que se incrementa aún más la **condensación de la cromatina**. Además, se adquiere el movimiento en el flagelo, primero en un patrón circular y finalmente con una **motilidad progresiva** (4).

Capacitación espermática y reacción acrosómica

Entre 10^7 - 10^8 espermatozoides llegan a la vagina de la mujer durante la eyaculación. De todos ellos, solo ~ 100 consiguen superar las barreras físicas y químicas hasta llegar a las trompas de

Falopio, lugar donde se encuentran con el ovocito y se da la fecundación. Además de esta selección durante su tránsito, los espermatozoides experimentan el proceso de **capacitación**. Este proceso permite que el espermatozoide responda a los estímulos del ovocito y que el movimiento flagelar se hiperactive. Al contrario que la maduración espermática, la capacitación puede darse *in vitro* en un medio de cultivo adecuado (4). La finalidad de todos los cambios producidos durante la capacitación es permitir la **reacción acrosómica** en el espermatozoide una vez llega al ovocito. Esto supone la liberación del contenido del acrosoma, una estructura de secreción producto de la modificación del aparato de Golgi durante la espermatogénesis (6) (Figura 5). El acrosoma contiene diferentes enzimas (proteinasas, glicosidasas, lipasas, fosfatasas, etc.) capaces de disolver las cubiertas ovocitarias para que el contenido genético del espermatozoide pueda llegar al ovocito (6).

1.1.3.2. Gametogénesis femenina

La **ovogénesis** o gametogénesis femenina es el proceso mediante el cual se generan ovocitos y se divide en dos fases: i) **etapa embrionaria o de diferenciación**, durante la vida fetal, y ii) **etapa de desarrollo**, a partir de la pubertad (3).

Etapa embrionaria

La ovogénesis tiene lugar en las gónadas femeninas, los **ovarios**, y también se inicia en la etapa fetal cuando las PGC llegan a las crestas germinales y se diferencian en **ovogonias**. Sobre la semana +6 p.c. los ovarios contienen ~26.000 ovogonias y ~240.000 células somáticas que las acompañan y regulan. Hacia la semana +9 p.c. el número se incrementa hasta ~250.000 ovogonias y ~1,4 millones de células somáticas (10). A partir de ese momento algunas ovogonias inician la meiosis pasando a **ovocitos primarios**. El resto prosiguen en fase proliferativa hasta llegar a los 5 meses p.c., cuando se llega al pico máximo en el número de ovogonias, llegando a ~3,5 millones por ovario, ~7 millones en total (11,12) (Figura 6).

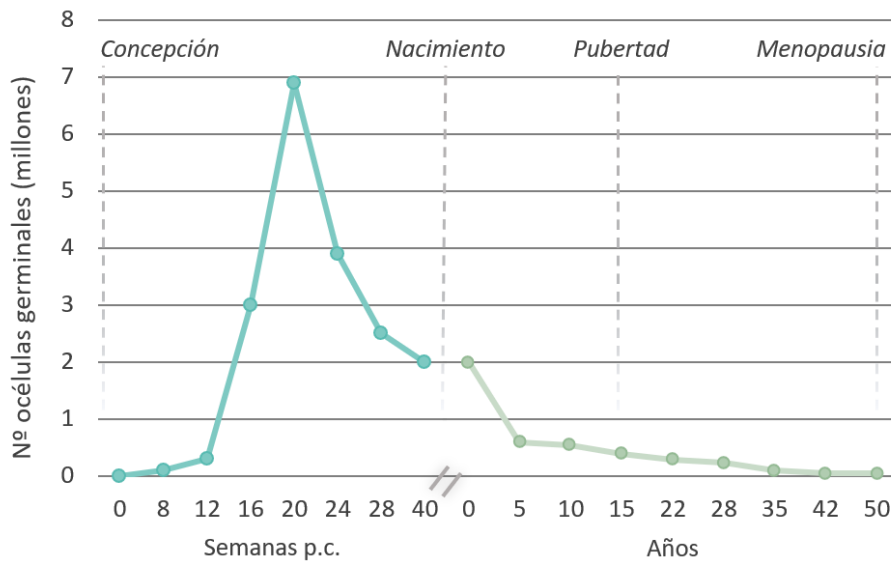


Figura 6. Gráfico del número de células germinales contenidas en los ovarios de una mujer durante la etapa fetal (de 0 a 40 semanas post-concepción (p.c.)) y durante su vida tras el nacimiento hasta la menopausia (de 0 a 50 años). Elaboración a partir de datos de Bendsen y col., 2006 (10).

Las ovogonias que inician la meiosis prosiguen el proceso hasta generar **ovocitos haploides** en estadio de profase I, concretamente hasta la subfase de dictioteno. Todos los ovocitos detienen el proceso meiótico en este punto y no se reanuda hasta que la mujer llega a la pubertad gracias a la hormona FSH (de sus siglas en inglés: *Follicle-Stimulating Hormone*).

Antes de la pubertad, aquellos ovocitos primarios que prosiguen el proceso de desarrollo hasta la etapa de folículo terciario, acaban muriendo por **atresia** o muerte celular al no estar aún bajo la influencia hormonal necesaria para su mantenimiento. Debido a esta pérdida celular constante, en la etapa prenatal se pierde aproximadamente el 75% de los ovocitos primarios derivados del total de ovogonias generadas (Figura 6). Al no generarse más ovogonias, una mujer ya cuenta con el número total de ovocitos que serán ovulados a lo largo de su vida desde su mismo nacimiento. Se estima que, al nacer, cada ovario contiene ~2 millones de folículos primarios. No obstante, la mayoría de estos folículos degeneran y solo ~400.000 llegan viables a la pubertad. Las mujeres de 37 años solo cuentan con ~25.000 ovocitos, número que se reduce a ~1.000 a la edad de la menopausia (10,13) (Figura 6).

Etapa de desarrollo

El momento clave de la fertilidad femenina se produce al inicio de la pubertad, sobre los 13 años (14). En este momento aumentan los niveles de la hormona FSH, lo que permite el mantenimiento de los folículos terciarios que, de otra forma, entran en atresia. Seguidamente, hay un aumento de la hormona luteinizante (LH, de sus siglas en inglés: *Luteinizing Hormone*) que permite la reanudación de la meiosis I y la consiguiente extrusión del **primer corpúsculo polar** en el ovocito dominante (Figura 2). Este corpúsculo expulsado contiene la mitad de los cromosomas, dejando una dotación haploide con dos cromátidas (n^2) en el ovocito. Este ovocito sigue su proceso de meiosis hasta la metafase II y se ovula en esta forma. Solo si el ovocito es fecundado por un espermatozoide acabará la meiosis II generando la extrusión del **segundo corpúsculo polar**, que contiene la mitad de las cromátidas hermanas. De esta forma, solo si es fecundado, un ovocito llega a generar la dotación haploide completa (n^1) (Figura 2).

Así pues, la etapa fértil de una mujer es finita (de los 13 a los 50 años aproximadamente) y se considera que tendrá ~450 **ciclos menstruales** (Figura 6). Esto supone que menos del 0,01% del total de ovogonias producidas en la etapa fetal, acaban siendo ovuladas.

1.2. Infertilidad humana

1.2.1. Descripción e incidencia

El estudio de la fertilidad humana ha mostrado que la tasa de concepción de una pareja sana en edad reproductiva es del 22-25% por cada ciclo menstrual de la mujer. En base a estas observaciones, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define la **infertilidad** como una enfermedad del sistema reproductor caracterizada por la imposibilidad de conseguir un embarazo viable después de 12 meses de relaciones sexuales sin contracepción durante la ventana fértil del ciclo menstrual (15). Según los antecedentes de la pareja, se puede diferenciar la **infertilidad primaria**, cuando la pareja nunca ha conseguido un embarazo o nunca

ha llegado a producirse un parto de un bebé vivo, y la **infertilidad secundaria**, cuando la pareja sí ha conseguido anteriormente un hijo vivo, pero actualmente no puede conseguir un embarazo o un parto de un bebé vivo (15).

La incidencia de la infertilidad humana parece diferir según la región del planeta estudiada ya que se ve afectada por factores como la contaminación, la nutrición, la economía o la densidad de población. Incluso, podría estar subestimada por la falta de datos fiables en algunas zonas (16). Aun así, se ha determinado que un 8-15% de las parejas en edad reproductiva sufren infertilidad (~48 millones de parejas en el mundo) (16,17). En cuanto a su etiología, se distribuye en partes iguales en relación a un factor masculino o femenino (18) (Figura 7).

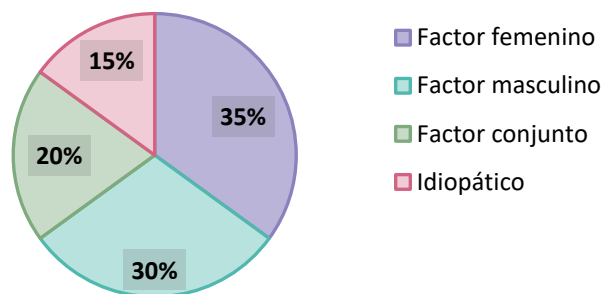


Figura 7. Etiología de la infertilidad. Elaboración a partir de datos de Vander Borgh y Wyns, 2018 (16).

1.2.2. Infertilidad masculina

1.2.2.1. Declive de la fertilidad en relación a la edad del varón

El efecto de la edad sobre la fertilidad masculina no es tan evidente como en el caso femenino (siguiente apartado) ya que los hombres mantienen una producción de espermatozoides continua a lo largo de su vida. No obstante, diferentes estudios han relacionado la edad del hombre con un aumento en la infertilidad (19,20). Por ejemplo, la **concentración espermática** ha mostrado un declive del 3,3% por cada año de edad del hombre (21–23). Aun así, este hallazgo está bajo discusión ya que otros estudios no han mostrado este declive o incluso han mostrado un aumento en la concentración espermática con la edad (19,24).

La **motilidad** de los espermatozoides sí parece estar directamente relacionada con la edad. Como se comentó en el apartado de Gametogénesis, la motilidad se adquiere durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo y a su paso por glándulas accesorias como la próstata. Así pues, la disfunción de estas glándulas en edades avanzadas parece influir negativamente en la motilidad espermática (19,25). También se ha encontrado una disminución progresiva de los niveles de **testosterona** conforme avanza la edad del varón, a un ritmo de 1,6% por año (26).

La acumulación de **mutaciones** en el genoma de las espermatogonias también se ha relacionado con la edad del varón. Se estima que cada espermatogonia se divide 30 veces por mitosis antes de la pubertad, 150 veces cuando el hombre tiene 20 años y hasta 800 veces a los 50 años. Como resultado, las espermatogonias de un hombre de mayor edad tienen un mayor riesgo de acumular mutaciones debidas a errores en la replicación. Esta acumulación de mutaciones también estaría relacionada con el empeoramiento de los sistemas de reparación del daño en el ADN (19).

La **aneuploidía** se define como la presencia de un número anómalo de cromosomas en una célula. Las evidencias apuntan a que no hay un incremento de estas anomalías por efecto de la edad (20). No obstante, existen pocos estudios que lo respalden si lo comparamos con los estudios femeninos en este ámbito.

1.2.2.2. Infertilidad adquirida

Además del empeoramiento en la fertilidad con el avance de la edad del hombre, existen diversas patologías o estados fisiológicos que pueden producir un empeoramiento del potencial fértil o una infertilidad temprana. Por ejemplo, el **cáncer testicular** afecta de forma directa a la fertilidad ya que compromete el tejido dónde se produce la propia espermatogénesis (27). La orquiectomía (extirpación quirúrgica del testículo) es el tratamiento más común en este tipo de cáncer, lo que conlleva un estado irreversible de infertilidad en el paciente si es bilateral.

También está ampliamente descrito el efecto gonadotóxico de la **quimioterapia** y la **radioterapia** que se recibe para el tratamiento de cualquier tipo de cáncer. En cuanto a la quimioterapia, se produce un daño que finaliza en la destrucción de todas las células en proliferación como las del tumor, pero también en las espermatogonias que están en fase proliferativa. En cuanto a la radioterapia, una dosis mayor de 4Gy parece producir un daño irreversible en la gametogénesis (27). En cualquier caso, las repercusiones en la fertilidad dependen de la dosis y el tipo de terapia recibidas (27).

También pueden ser causa de infertilidad algunas **alteraciones anatómicas** como la falta de conducto deferente en hombres portadores de una mutación en el gen CFTR o afectos de fibrosis quística (4,28); alteraciones hormonales como el hipogonadismo, que generan una disminución de testosterona (18); varicocele, que genera un reflujo sanguíneo en las venas del plexo pampiniforme (29,30); infecciones o la eyaculación retrógrada, entre otros (31).

El consumo de **café, tabaco, alcohol o drogas** también han demostrado afectar negativamente a la fertilidad masculina (32). El consumo elevado de café se ha relacionado con un empeoramiento de los parámetros seminales y un mayor daño en el ADN espermático (33). En cuanto al tabaco, está descrito que algunos de sus componentes como el arsénico o el cadmio tienen propiedades mutagénicas que se han asociado con la infertilidad. También se ha mostrado una disminución de los parámetros seminales en hombres fumadores (34). En cuanto al alcohol, en un estudio de 1984 se mostró que más de la mitad de los hombres con alcoholismo crónico presentan fallos en la espermatogénesis y un tamaño testicular menor (35). Además, estos hombres presentan alteraciones en los niveles hormonales de FSH, LH, estrógenos y testosterona. El consumo de drogas (cannabis, cocaína, opiáceos o anfetaminas) también han mostrado un impacto negativo en la fertilidad masculina (32).

Todos estos factores pueden acabar provocando diversas alteraciones en los espermatozoides y su ADN: alteraciones en la organización de la cromatina (36); alteración en el balance de las protaminas P1/P2 (37); alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales (2); alteraciones epigenéticas (38); fragmentación del ADN (39,40); microdeleciones del cromosoma Y (41) o la presencia de anticuerpos antiespermáticos en el eyaculado (42).

1.2.3. Infertilidad femenina

1.2.3.1. Declive de la fertilidad en relación con la edad de la mujer

Como se ha mencionado anteriormente, el potencial fértil de una mujer sana se acota en una ventana que empieza en la pubertad, con el inicio de ciclos menstruales, y termina en la menopausia, cuando se produce la última menstruación. Así pues, a partir de la **menopausia** se produce una infertilidad femenina natural ya que dejan de producirse ovulaciones. Dentro la ventana de fertilidad, cabe destacar diferentes fases.

En mujeres sanas, la fertilidad se considera óptima entre los 20-25 años. A partir de ese momento la fertilidad disminuye a un ritmo lento hasta los 35 años y muestra una reducción muy significativa a partir de esa edad. Relacionado con la edad, no solo hay una disminución de la reserva ovárica (Figura 6), sino que también se ha registrado una menor tasa de embarazos y un mayor número de mujeres que sufren fallos de ovulación, abortos, mortalidad perinatal o que gestan fetos con alteraciones genéticas (3).

Se ha observado que el riesgo de que un ovocito sea **aneuploide** se incrementa con la edad, siendo de solo del 2-3% en mujeres de 20 años, incrementándose hasta el 35% hacia los 40 años y llegando a ser del 50% en los últimos años fértiles (43,44). Aunque la causa de este incremento no está clara, parece estar relacionada con errores que se producen en la meiosis I y la meiosis II, especialmente afectando al huso meiótico que genera una no-disyunción de los cromosomas (13). Estos valores podrían ser incluso mayores ya que en un estudio de Bettaglia y col. en 1996

se observó que el 79% de los ovocitos recogidos de mujeres entre 40-45 años presentaban uno o más cromosomas desviados en la placa metafásica en la meiosis II. Esto solo ocurría en el 17% de los ovocitos en mujeres de 20-25 años (45).

Las consecuencias de fecundar un ovocito aneuploide son diversas, pero en todos los casos graves. En general, la presencia de un número incorrecto de cromosomas no es soportada por el cigoto o el embrión y se produce un **aborto** que puede incluso no ser detectado al producirse de forma muy temprana. Para algunos cromosomas (13, 18, 21, X e Y), la presencia de una aneuploidía del cromosoma entero no es incompatible con la vida, aunque los bebés nacidos sufren síndromes derivados: Síndromes de Patau, Edwards y Down, por trisomías en los autosomas 13, 18 y 21, respectivamente; y Síndromes XXX, Klinefelter o XYY, por trisomías en los cromosomas sexuales; o el Síndrome de Turner, con cariotipo 45,X (3) (Tabla 1).

Tabla 1. Incidencia de las alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos. Traducido de Johnson, 2007 (3).

Alteraciones cromosómicas en el feto	Casos cada 100 abortos	Tasa de supervivencia (%)
Triploidía (3n)	12-15	<0,01
Tetraploidía (4n)	3-5	<0,01
Trisomías en cromosomas sexuales (tres X/Y)	<1	>99
Monosomías en cromosomas sexuales (un X o Y)	10	<1
Trisomía en uno o dos autosomas	20-40	3
Monosomía en uno o dos autosomas	1	0
Reorganizaciones estructurales entre cromosomas	2-3	35

1.2.3.2. Infertilidad adquirida

A parte del declive natural en la fertilidad femenina relacionado con la edad, la condición de infertilidad puede darse en edades prematuras debido a diferentes situaciones como: alteraciones anatómicas del sistema reproductor; alteraciones en la ovulación (menopausia precoz); desórdenes hormonales; el síndrome del ovario poliquístico o también puede estar derivada de la exposición a tóxicos como el tabaco o tratamientos como la quimioterapia o la

radioterapia (13). Alteraciones genéticas en la propia mujer como el Síndrome de Turner o el Síndrome del cromosoma X frágil pueden desencadenar insuficiencia ovárica prematura (16).

Las alteraciones del aparato reproductor femenino son la causa más importante de infertilidad en mujeres. El **factor tubárico** puede estar asociado a una infección no tratada (por ejemplo, por gonorrea o clamidias) que lleva a la pérdida de la integridad del epitelio evitando el correcto transporte de los espermatozoides hasta el ovocito (46). También puede darse una restricción del movimiento en el oviducto que impide el avance del ovocito. Dentro del factor tubárico se encuentra también la endometriosis, enfermedad caracterizada por el desarrollo de tejido endometrial fuera del útero, por ejemplo, en los oviductos o los ovarios (46).

1.3. ADN espermático

Las células eucariotas, incluyendo los gametos, contienen dos tipos de ADN: **nuclear** y **mitocondrial**. Puesto que las mitocondrias del espermatozoide se destruyen tras la fecundación (47), los estudios sobre el daño en el ADN se han centrado en el ADN nuclear.

1.3.1. ADN espermático mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos celulares destinados a la producción de energía en forma de ATP que permiten el movimiento flagelar del espermatozoide (Figura 5). No obstante, durante la producción del ATP se generan altos niveles de **estrés oxidativo** mediante la producción de **especies reactivas de oxígeno (ROS)**, de sus siglas en inglés: *Reactive Oxygen Species*). Entre las ROS se encuentran diferentes moléculas altamente reactivas como el radical hidroxilo, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (48). Como el ADN mitocondrial no está compactado con histonas ni protaminas, queda totalmente expuesto y es dañado por estas ROS (49). Además, las mitocondrias no cuentan con un sistema de reparación de daño en el ADN, por lo que su genoma es hasta 100 veces más susceptible al daño que el genoma nuclear (50).

Este daño oxidativo generado de forma endógena no solo daña el ADN mitocondrial, sino que también puede afectar al genoma nuclear y a la viabilidad de todo el espermatozoide puesto que puede activar el mecanismo de **apoptosis** o muerte celular por la vía intrínseca (51). El movimiento flagelar también puede verse afectado ante niveles elevados de ROS debido a la **peroxidación** de las membranas celulares y mitocondriales, lo que genera una mala movilidad del espermatozoide y problemas en la cadena de transporte electrónico para formar ATP (52).

1.3.2. ADN espermático nuclear

1.3.2.1. Nivel de condensación

En comparación con el ADN de las células somáticas, que está empaquetado unido a histonas, el ADN espermático tiene un nivel de compactación mayor gracias al cambio de las histonas por las **protaminas P1 y P2**. Estas proteínas son más pequeñas que las histonas y son ricas en arginina, lo que les confiere carga positiva (4). Esta carga permite la **hipercondensación** de la cromatina al unirse a las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN. Además, las protaminas también son ricas en cisteína, que establecen **puentes disulfuro** entre sí a medida que el espermatozoide transita por el epidídimo de forma que se va incrementando cada vez más el estado de condensación (4). Al finalizar el proceso de hipercondensación, el ~85% de las histonas son reemplazadas por protaminas, mientras que el ~15% restante del genoma masculino permanece unido a histonas. Tras la fecundación, se vuelven a intercambiar las protaminas por histonas para descompactar el pronúcleo masculino y permitir la transcripción del genoma paterno (4).

La hipercondensación permite almacenar el contenido genómico masculino en un gameto notablemente más pequeño (~5µm de largo en la cabeza y ~50µm contando la cola) que un ovocito (~120µm de diámetro) (1). Además, permite proteger la integridad el ADN paterno durante su tránsito por todas las estructuras de los aparatos reproductores masculinos y

femeninos. Aunque en los primeros estudios realizados sobre la cromatina espermática se consideró esta estructura como altamente estable e infranqueable por cualquier agente físico o químico (53), estudios más recientes han observado que la cromatina espermática no es completamente inaccesible y que sí puede ser susceptible de sufrir daños (54).

1.3.2.2. Organización de la cromatina y del núcleo espermático

En los años 80 se estableció el llamado “**modelo de donut**” para explicar la organización de la cromatina espermática (Figura 8). Este modelo propone que el ADN unido a protaminas forma **estructuras toroidales** gracias a las fuerzas de torsión inducidas por los puentes disulfuro (55,56). Cada toroide permite la compactación de un lazo de ADN de 25-50kb (57). Cada lazo se une al siguiente dejando en medio una región de ADN fuera de los toroides que se une a la matriz nuclear (**regiones MAR**, de sus siglas en inglés: *Matrix Attachment Regions*) (56,58). Al quedar fuera de los toroides, las regiones MAR permanecen unidas a histonas, lo que implica que su nivel de compactación sea menor y, en consecuencia, que sean regiones más susceptibles a daños (56) (Figura 8). Algunos autores sugieren que estas regiones de menor compactación y mayor accesibilidad son, precisamente, las regiones del ADN paterno que serán transcritas en las primeras etapas del desarrollo embrionario (56).

Además de estar altamente compactado, el ADN espermático se organiza dentro del núcleo en regiones conservadas. El “**modelo de Zalensky**” indica que los telómeros quedan anclados en la membrana nuclear y la parte central de los cromosomas se dispone hacia el centro nuclear ocupando un territorio concreto (59–61) (Figura 9). También se ha encontrado que aquellos cromosomas con mayor densidad génica o aquellas zonas cromosómicas que contienen más genes se sitúan hacia el interior del núcleo, mientras que las regiones con menor densidad génica se sitúan en la periferia (Figura 9). Se postula que esta organización también responde a la necesidad de protección de las zonas más críticas del genoma (60).

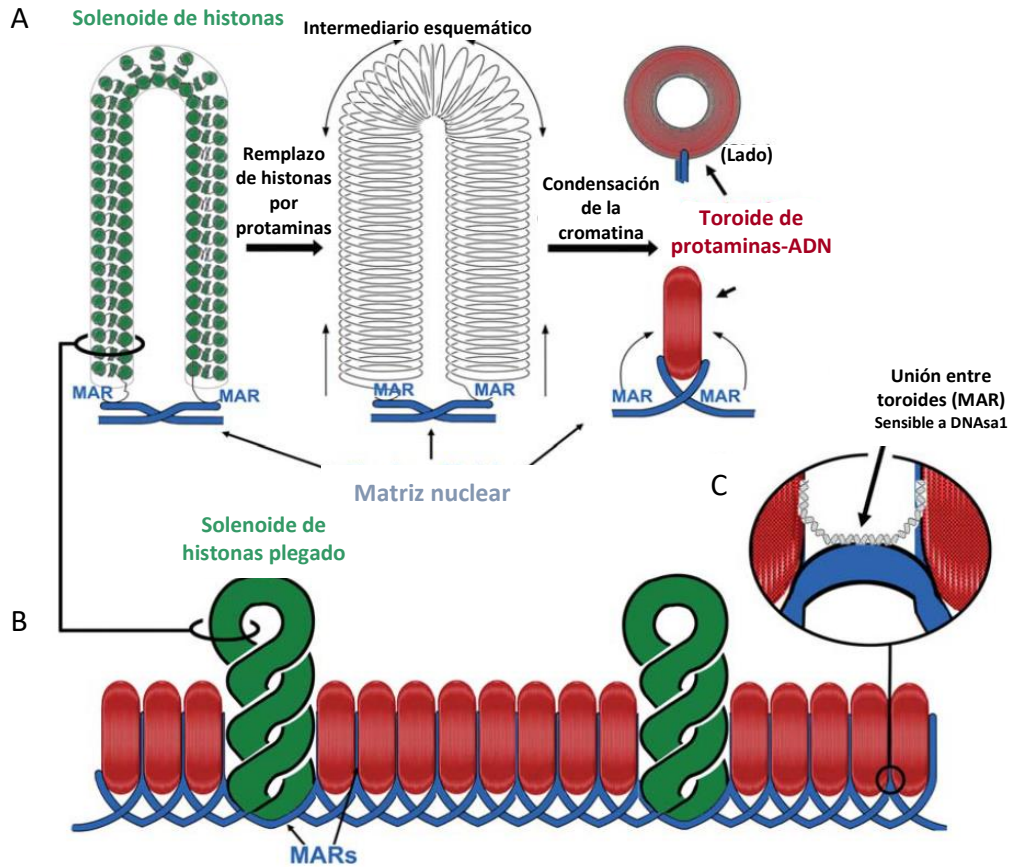


Figura 8. Modelo de los elementos estructurales en la cromatina espermática. (A) Condensación de la cromatina al intercambiar las histonas por protaminas formando toroides. (B) Agrupación de los toroides con zonas intermedias unidas a histonas. (C) Región del ADN de unión a la matriz nuclear. Figura traducida de Ward, 2010 (56).

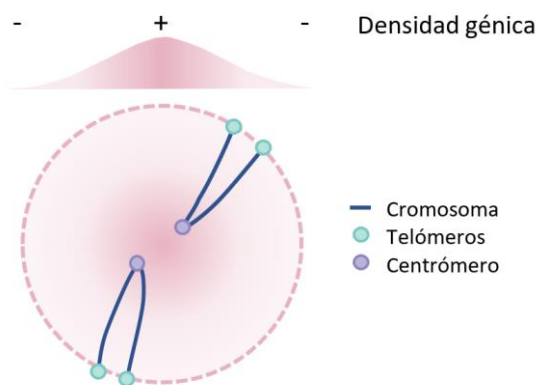


Figura 9. Esquema de la arquitectura del núcleo espermático según el modelo de Zalensky: los telómeros se sitúan por pares y anclados a la membrana nuclear, mientras que los centrómeros se sitúan hacia el centro del núcleo, coincidiendo con las regiones de mayor densidad génica.

1.3.2.3. Tipos de daño en el ADN espermático

Diferentes agentes endógenos y exógenos pueden alterar la integridad del ADN produciendo distintos daños moleculares (Figura 10). Entre ellos, las roturas en las cadenas de ADN pueden ser de dos tipos: **roturas de cadena sencilla (SSB)**, de sus siglas en inglés: *Single-Strand Breaks*) cuando afectan a una sola de las cadenas; o **roturas de cadena doble (DSB)**, de sus siglas en inglés: *Double-Strand Breaks*) cuando afectan a las dos cadenas (62) (Figura 10).

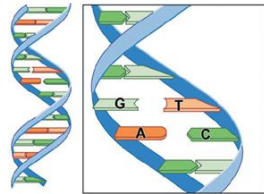
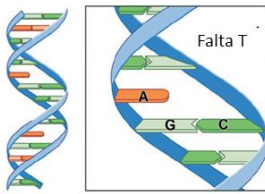
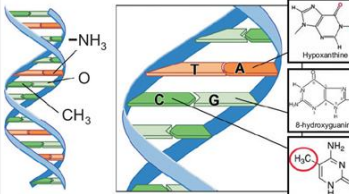
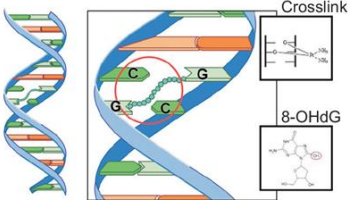
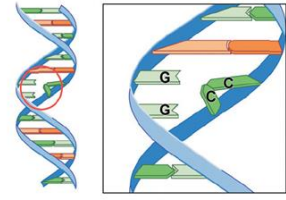
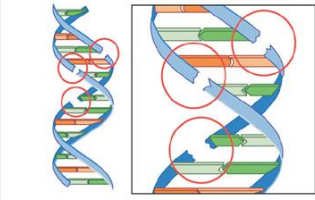
Bases mal apareadas (mismatch)	Sitios abásicos	Modificaciones de bases (oxidación, alquilación, desaminación)
Inducido por errores de replicación	Inducido por ROS	Inducido por ROS, UV y agentes alquilantes
		
Aductos y enlaces cruzados (crosslink)	Dímeros de pirimidina	Fragmentación de cadena sencilla o doble
Inducido por carcinógenos y ROS	Inducido por luz UV	Inducido por ROS, químicos, radiación, errores en la horquilla de replicación
		

Figura 10. Tipos de daño en el ADN. Traducida de Agarwal, 2020 (62).

1.3.3. Fragmentación del ADN espermático

De los diferentes tipos de daños que se pueden producir en el ADN de los espermatozoides, la presente Tesis Doctoral se centra en las roturas de tipo SSB y DSB.

1.3.3.1. Roturas de cadena sencilla

Las **ROS** son la fuente principal de daño en el ADN espermático ya que pueden generar roturas al oxidar la base nitrogenada guanina: primero se genera el aducto 8-OH-guanina, luego la forma 8-OH-2'desoxiguanosina (8-OHdG) y, finalmente, se produce un **SSB** (Figuras 10 y 11). Este daño suele ser extensivo ya que puede ocurrir a lo largo de todo el genoma (63).

En el propio espermatozoide, solo es posible reparar los SSB hasta que se produce la hipercondensación de la cromatina (64). Además, se postula que el ovocito, y el subsiguiente embrión, tienen cierta capacidad de reparación del ADN espermático (65,66).

La reparación de una rotura SSB es más eficiente si se compara con una rotura DSB ya que el sistema de reparación dispone de un molde en la cadena complementaria sana (67). En este caso, se puede utilizar la vía de **reparación de escisión de bases** (BER, de sus siglas en inglés: *Base Excision Repair*). La enzima ADN glicosilasa genera un sitio abásico en el lugar de la base dañada, una endonucleasa degrada también las bases colindantes para que, posteriormente, la ADN polimerasa pueda acceder y copiar la secuencia de la cadena complementaria.

1.3.3.2. Roturas de cadena doble

Las DSB se pueden producir de forma localizada o extensiva, y se producen mayoritariamente por acción enzimática.

Las **roturas localizadas** ocurren cuando se activan nucleasas y/o caspasas endógenas tras la espermatogénesis y cuando el ADN ya está empaquetado en toroides. Se cree que estas enzimas solo pueden acceder a regiones menos compactadas del genoma (las **regiones MAR**). Es por ello que el número de DSB es limitado en comparación al daño por SSB, que puede ser extensivo al afectar a todo el genoma (63) (Figura 11).

Las **roturas extensivas** pueden ocurrir en dos etapas distintas (Figura 11). En primer lugar, durante la **recombinación homóloga** en la fase de leptoteno de la meiosis I, la endonucleasa Spo11 induce DSB en los puntos calientes de recombinación, ricos en guanina-citosina (68) que se deben reparar tras la recombinación. Si no lo hacen, pueden dar lugar a reorganizaciones o fragmentación del ADN espermático (69). En segundo lugar, McPherson y Longo postularon que durante la **remodelación de la cromatina** para su hipercondensación es necesaria la inducción

de roturas en el ADN mediante endonucleasas (70). La Topoisomerasa II produce DSB para permitir la torsión y luego liga los extremos libres (71). Si el proceso de ligado falla se pueden encontrar DSB en el ADN espermático. Además, un mayor número de DSB podrían producirse si hay una mala compactación de la cromatina ya que habría sitios susceptibles a la acción enzimática y también a sufrir daños en la fase post-testicular (69).

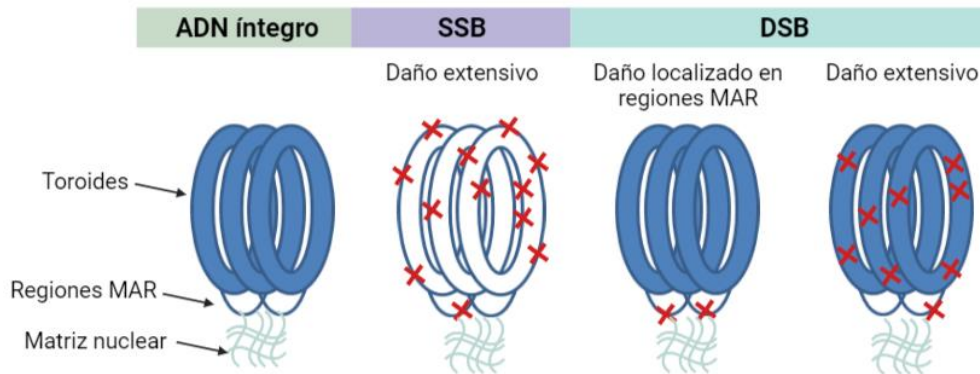


Figura 11. Tipos de rotura en el ADN de los espermatozoides. Las roturas de cadena sencilla (SSB) afectan a una de las cadenas de ADN de forma extensiva por mecanismos oxidativos. Las roturas de cadena doble (DSB) se generan por mecanismos enzimáticos y pueden afectar a las regiones MAR generando un daño localizado, o pueden afectar a todas las regiones del genoma generando un daño extensivo si hay una cromatina inmadura.

Las roturas de este tipo se consideran más perjudiciales que las SSB puesto que los sistemas de reparación del ADN del embrión no disponen de un molde para repararlas eficazmente (64). Así pues, el mecanismo de reparación habitual es la **unión de extremos no homólogos** (NHEJ, de las siglas en inglés: *Non-Homologous End Joining*), que une extremos próximos, pero sin asegurar la continuidad del mismo cromosoma o la fidelidad del mensaje. En este caso, se prioriza la supervivencia de la célula sobre la fidelidad del mensaje genómico. Ésta puede ser una estrategia admisible teniendo en cuenta que supone una reparación más rápida y la gran cantidad de contenido genómico no codificante presente en el conjunto del ADN. No obstante, cuando la rotura afecta a una zona codificante o reguladora, o incluso cuando se genera inversión o una translocación entre brazos de diferentes cromosomas, esta reparación puede llevar a una alteración incompatible con la supervivencia celular o del individuo (72).

Solamente cuando una cadena molde en la cromátida hermana está disponible se pueden reparar los DSB mediante **recombinación homóloga**. Este proceso sí mantiene la integridad de la secuencia, pero solo ocurre durante las fases S y G2 del ciclo celular previo a la meiosis. Se inicia mediante el reconocimiento del daño por el complejo MRN (Mre11+Rad50+Nbs1) que activan los principales reguladores de la vía, las **quinasas ATM y ATR** (de sus siglas en inglés: *Ataxia-Telangiectasia-Mutated* y *ATM- and Rad3-Related*, respectivamente).

1.3.3.3. Origen de las roturas en el ADN espermático

Las roturas en el ADN espermático pueden ocurrir mediante diferentes mecanismos y en diferentes localizaciones (67) (Figura 12). Además, los diversos mecanismos que causan roturas no son excluyentes entre sí y podrían darse tanto por separado como conjuntamente.

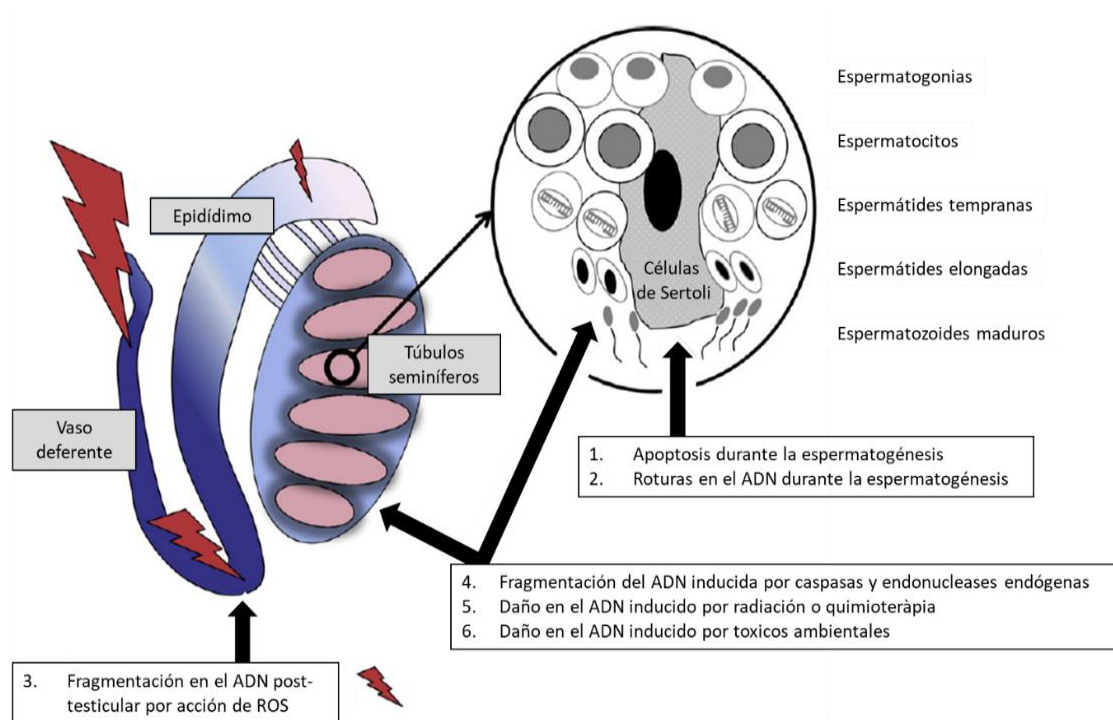


Figura 12. Mecanismos de daño en el ADN. Traducida de Sakkas y Álvarez, 2010.

Apoptosis durante la espermatogénesis

Se estima que un 50-75% de las células germinales que un hombre produce cada día contienen algún tipo de anomalía. El mecanismo para destruir estas células es el de muerte celular

programada y sin inflamación: la **apoptosis** (4,67,73). La eliminación masiva de células también responde a la necesidad de mantener un equilibrio en el tejido espermático ya que las células de Sertoli solo pueden sustentar un número limitado de células germinales (74).

La apoptosis se basa en el reconocimiento y destrucción de células anómalas. En este caso, las células meióticas o post-meióticas anómalas expresan la molécula fosfatidilserina y el marcador *Fas* en su membrana. Las células de Sertoli reconocen estos marcadores y se unen a los espermatozoides mediante el receptor *Fas-Ligando (FasL)* desencadenando el mecanismo de apoptosis por la vía intrínseca y, finalmente, fagocitan los espermatozoides. Durante este proceso aumenta el estrés oxidativo generando SSB y se activan endonucleasas que generan DSB (75). También se activan caspasas que destruyen proteínas implicadas en la organización del núcleo y el citoesqueleto (76).

Este sistema de detección y eliminación de células puede no ser óptimo o verse sobrepasado. Si esto ocurre, se pueden encontrar espermatozoides eyaculados genéticamente anómalos con roturas en su ADN y fosfatidilserina (67). Este proceso se conoce como “**apoptosis abortiva**” y se ha asociado con alteraciones de la fertilidad del varón. Diversos estudios han encontrado una mayor proporción de espermatozoides *Fas*-positivos en pacientes con baja concentración de espermatozoides en comparación con hombres normozoospermicos (77).

Defectos en la cromatina

Las protaminas P1 y P2, implicadas en la hipercondensación de la cromatina espermática, se expresan en una proporción 1:1 en varones sanos. Esta hipercondensación se ve comprometida cuando la **proporción P1/P2** está alterada (4,8), dando lugar a una mayor susceptibilidad al daño en el ADN del espermatozoide (78).

Algunos estudios han mostrado una elevada presencia de **espermatozoides inmaduros** (con una mala compactación de la cromatina) en varones infértiles portadores de alteraciones

cromosómicas o con varicocele (78). También se han observado valores incrementados de roturas en el ADN y la presencia de núcleos degradados en pacientes con varicocele (79).

Estrés oxidativo

Hay diferentes procesos implicados en la fertilidad masculina que requieren la presencia de **ROS** (48) (Figura 13). Para mantener un correcto balance oxidante-reductor existen **antioxidantes fisiológicos** como las enzimas superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa, o agentes no enzimáticos como las vitaminas A, C y E, la coenzima Q10, el glutatión, los β -carotenos, el selenio o el zinc (48).

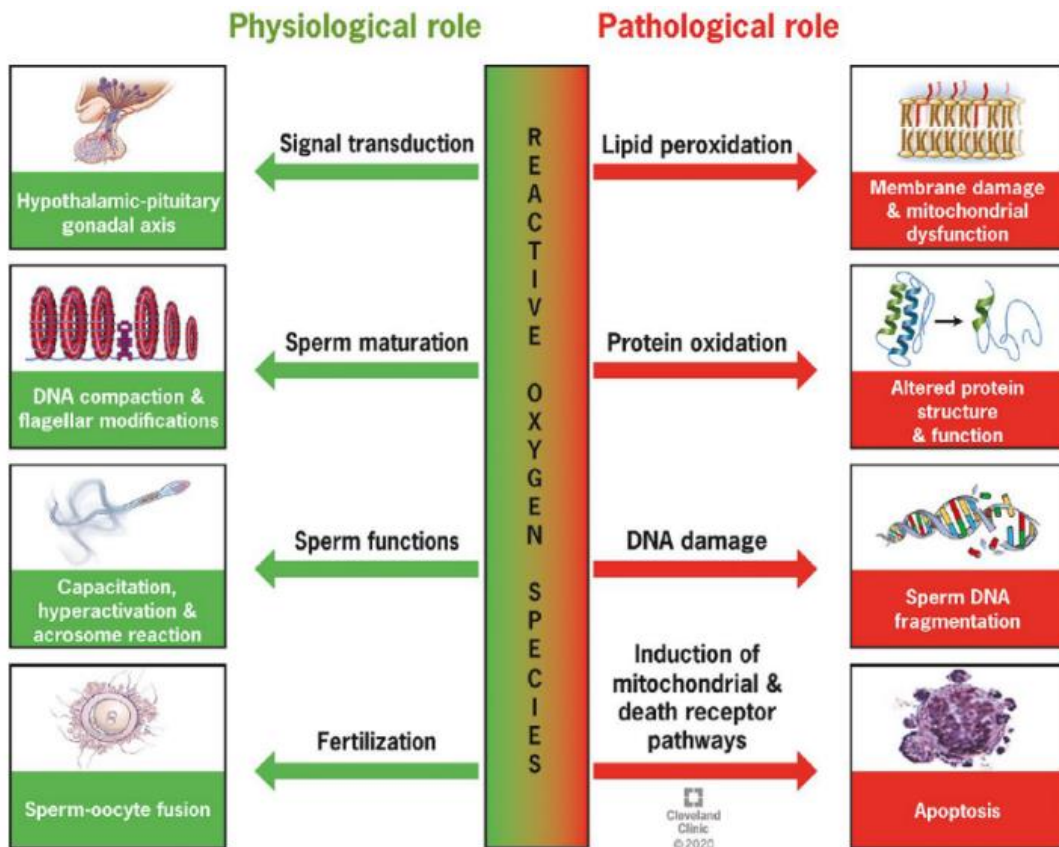


Figura 13. Papel de las especies reactivas de oxígeno en la fertilidad masculina. Figura de Agarwal y col., 2020 (48).

El **estrés oxidativo** aparece cuando se altera el balance ROS-antioxidantes y numerosos estudios han encontrado un papel crucial de este factor en la infertilidad masculina (48) (Figura 13). En cuanto a la fragmentación en el ADN espermático, las ROS generan roturas del tipo SSB de forma

directa al oxidar las guaninas. Además, también pueden generar roturas del tipo DSB de forma indirecta al activar la apoptosis (48,63). Un ejemplo de alteración fisiológica que conlleva el aumento del estrés oxidativo es el varicocele (29,80).

Otras causas de roturas

Como ejemplo del efecto conjunto entre los mecanismos de producción de daño, se ha observado que los **espermatozoides inmaduros** (mala compactación del ADN) también producen niveles elevados de **ROS**. Estas ROS pueden dañar el ADN del propio espermatozoide pero también pueden activar nucleasas y caspasas endógenas y, por lo tanto, la **apoptosis**.

El estrés oxidativo producido por los espermatozoides inmaduros también puede afectar a los espermatozoides sanos que los acompañan durante su migración conjunta (67). Este **daño post-testicular** lleva a encontrar niveles más elevados de fragmentación en espermatozoides eyaculados que en espermatozoides recuperados del testículo. Es por ello que la biopsia testicular para obtener espermatozoides con un menor daño en el ADN es una práctica realizada en reproducción asistida. En este sentido, un estudio de Greco y col. (81) mostró que estos espermatozoides testiculares permiten obtener mejores tasas de embarazo en pacientes que previamente habían mostrado fallos al utilizar espermatozoides eyaculados.

La presencia de **infecciones** o **inflamación** en el tracto reproductor masculino también puede causar infertilidad y generar roturas en el ADN de los espermatozoides al aumentar el estrés oxidativo (54,82). Un estudio de O'Flaherty y col. mostró un aumento de fragmentación en el ADN espermático en pacientes con **cáncer** testicular y linfoma de Hodking (83). Las **radiaciones ionizantes y no-ionizantes** también pueden producir fragmentación en el ADN espermático (84), así como la **contaminación** atmosférica. De hecho, se ha determinado que la ausencia en homocigosis del gen de la glutatión-S-transferasa M1 hace menos eficiente la detoxificación de hidrocarburos presentes en el aire contaminado y un aumento de la fragmentación (85).

1.3.4. Fragmentación del ADN y su efecto sobre la fertilidad

Los varones fértiles suelen presentar parámetros seminales normales y una buena integridad en el ADN espermático. Por el contrario, los varones infértiles pueden presentar un seminograma normal o alterado coexistiendo con valores elevados de fragmentación (40,86).

También se ha estudiado la aplicación clínica del diagnóstico de la fragmentación. En 2013, la sociedad americana ASRM (de sus siglas en inglés: *American Society for Reproductive Medicine*) publicó una guía sobre este ámbito tras realizar un exhaustivo análisis de la literatura publicada hasta esa fecha. Se concluyó que no existía una correlación suficientemente fuerte entre los valores de fragmentación y los resultados reproductivos (87). En la presente tesis doctoral se pretende dar respuesta a esta falta de asociación.

Desde la publicación de ASRM en 2013 hasta la actualidad han surgido nuevos estudios sobre la fragmentación. Se va visto que, desde el punto de vista del genoma paterno, la viabilidad del embrión obtenido tras la fecundación puede variar según la intensidad del daño (por ejemplo, el número de roturas) o la zona del genoma afectada (por ejemplo, una zona codificante de un gen vital) (64). Tanto si las roturas no se reparan como si el embrión las repara, pero de forma anómala, se podría producir un bloqueo en el desarrollo embrionario, impidiendo llegar al estadio de blastocisto o, incluso, impidiendo la implantación. Esta situación se ha denominado “**efecto paterno tardío**” (88) (Figura 14).

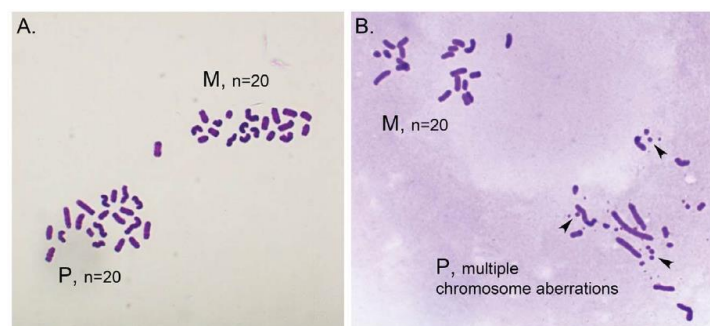


Figura 14. Pronúcleos maternos (M) y paternos (P) en embriones de ratón. (A) Pronúcleos normales. (B) Pronúcleo materno normal y pronúcleo paterno con múltiples anomalías. Figura de Gawecka y col., 2013 (89).

1.3.4.1. *Fragmentación de cadena sencilla y fertilidad*

Niveles elevados de SSB en el eyaculado se han asociado con una **menor movilidad** de los espermatozoides (54,90,91). Esta relación no es de causa-efecto, sino que ambas alteraciones comparten un mismo origen: el estrés oxidativo. Las ROS generan SSB a través de la oxidación de las guaninas y alteran la movilidad al peroxidar las membranas del espermatozoide e interferir con el correcto funcionamiento de las mitocondrias.

El potencial del espermatozoide para conseguir llevar a cabo un **embarazo natural** mostró estar inversamente relacionado con los niveles de SSB (40). Aplicado a ciclos de **reproducción asistida**, un estudio de Simon y col. mostró que la **tasa de fecundación** se veía disminuida cuando la muestra presentaba valores elevados de SSB al aplicar ciclos de fecundación *in vitro* convencional (FIV) (92). En estos ciclos la fecundación ocurre de forma natural al exponer el ovocito a la muestra seminal. En cambio, no se observaba este efecto en ciclos de ICSI dónde el embriólogo microinyecta un único espermatozoide seleccionado dentro del ovocito. Un estudio reciente de Casanovas y col. ha mostrado que, una vez superada la fecundación, la presencia de SSB en la muestra espermática no tiene un efecto sobre la **cinética embrionaria**, al menos, hasta el estadio de blastocisto (93). En cuanto a la **tasa de embarazo**, se ha visto una asociación negativa con valores elevados de SSB cuando se realizan ciclos de IUI o FIV (92,94). Otros estudios han mostrado que la tasa de nacido vivo también se ve disminuida cuando hay valores elevados de SSB en ciclos de FIV (95).

1.3.4.2. *Fragmentación de cadena doble y fertilidad*

El origen de los DSB es mayoritariamente enzimático, ya sean roturas producidas para permitir la hipercondensación que luego no se reparan, o roturas inducidas por nucleasas activadas por diferentes mecanismos (69) (Figura 11). Al tener distintos orígenes, no se ha encontrado una correlación entre los niveles de DSB y la movilidad de los espermatozoides (96).

En el reciente estudio de Casanovas y col. se vio que la microinyección de ovocitos con espermatozoides provenientes de una muestra de eyaculado con elevados niveles de DSB da lugar a un retraso en la **cinética embrionaria** en diferentes estadios del desarrollo. Como se ha comentado, esto no ocurría con muestras con elevados niveles de SSB (93). En la presente Tesis Doctoral se pretende dar respuesta a este efecto diferencial.

En cuanto al efecto sobre los resultados reproductivos, parece que valores elevados de DSB no afectan a la capacidad de conseguir un embarazo natural. En ciclos de ICSI tampoco se ha observado una disminución de la tasa de fecundación pero sí de la **tasa de implantación** (93,97). Un estudio de Garolla y col. mostró que la **tasa de embarazo** se veía disminuida en pacientes con valores elevados de DSB (98). No obstante, otro estudio de Ribas-Maynou y col. no mostró esta disminución (97). También se ha observado un mayor **riesgo de aborto** cuando los valores de DSB en el eyaculado son elevados (62,97,99). De forma coherente, la **tasa de nacido vivo** también se ve disminuida cuando hay valores elevados de DSB (96).

1.4. Evaluación de la infertilidad masculina

El factor masculino contribuye casi en la misma proporción que el factor femenino en la fertilidad de una pareja (Figura 7), por lo que ambos integrantes de la pareja deberían ser evaluados de forma simultánea ante un caso de infertilidad. No obstante, la evaluación conjunta solo ocurre en el 18% de los casos mientras que la búsqueda de un factor detrimento de la fertilidad se basa en una exploración solamente femenina en el resto de parejas (100).

1.4.1. Evaluación básica

Se ha determinado que hasta un 70% de los casos de infertilidad masculina podrían ser detectados en una consulta de andrología si se emplearan técnicas de diagnóstico básicas como las descritas a continuación (18).

1.4.1.1. *Revisión del historial médico*

Una anamnesis completa del paciente puede ser de gran utilidad para la posible detección de factores de riesgo relacionados con su condición fisiológica o sus hábitos de consumo, la exposición a tóxicos, posibles interferencias de otras medicaciones, antecedentes familiares de infertilidad o la presencia de una infección en el tracto reproductor (31).

1.4.1.2. *Exploración física y ecográfica*

La exploración física del aparato reproductor permite detectar anomalías anatómicas en el pene, los testículos (especialmente valorando la presencia de varicocele o neoplasias) o la detección de los vasos deferentes y del epidídimo. También se puede realizar una evaluación de las características sexuales secundarias o un examen rectal (31).

1.4.1.3. *Evaluación hormonal*

Para la evaluación de la fertilidad del varón se pueden estudiar las hormonas implicadas en el proceso de producción de espermatozoides, incluyendo la medición de los niveles de las hormonas FSH, LH, testosterona o prolactina (31). El hipogonadismo hipogonadotrófico ocurre cuando hay un fallo en el eje hipotálamo-pituitario, encargado de la estimulación de las gónadas. Una disminución del funcionamiento de este eje podría deberse a una infección, un trauma en el cerebro, un defecto congénito, un tumor cerebral o el abuso de drogas (31).

1.4.1.4. *Seminograma*

El seminograma es la prueba diagnóstica que evalúa **parámetros macroscópicos** (pH, volumen, viscosidad o color), y **parámetros microscópicos** (vitalidad, concentración, morfología y motilidad) de los espermatozoides eyaculados. Tras el estudio de varones fértiles, la OMS¹ ha

¹ En 2021 se ha publicado la sexta edición del manual de la OMS sobre el “Examen y procesamiento de semen humano”(107). La presente tesis doctoral ha tenido en cuenta los parámetros descritos en la quinta edición del mismo manual que pueden tener ligeras variaciones respecto la nueva edición.

establecido los valores de normalidad para estos parámetros (101). Aun así, la propia OMS pone de manifiesto que los valores de seminograma son muy fluctuantes a corto, medio y largo plazo ya que están sujetos a múltiples variables como: el tiempo de abstinencia, la recogida por masturbación o con preservativo, el estado de las glándulas accesorias, la presencia de fiebre o infecciones, la exposición a tóxicos o a radiaciones, el consumo de tabaco, alcohol o drogas o la temperatura ambiental, entre otros (102,103).

Puesto que existen individuos con parámetros seminales alterados que muestran capacidad de procreación y, de forma contraria, al menos un 15% de individuos con seminograma normal muestran infertilidad, numerosos estudios afirman que los resultados del seminograma para la evaluación de la fertilidad masculina no deberían ser concluyentes (104). Así pues, se han desarrollado otras técnicas de evaluación del potencial fértil como: el estudio de la fragmentación del ADN; la detección de anticuerpos anti-espermáticos; el análisis genético, para detectar microdeleciones en la región AZF (de sus siglas en inglés: *azoospermia factor*) del cromosoma Y o la presencia del gen CFTR; el estudio de aneuploidías mediante el marcaje fluorescente con la técnica FISH (de sus siglas en inglés: *Fluorescent In Situ Hybridization*) (105); el estudio de la meiosis, para detectar las fases de la formación de los espermatozoides en una biopsia testicular (106); o el cariotipo, para detectar enfermedades genéticas relacionadas con la infertilidad como el Síndrome de Klinefelter (31).

1.4.2. Detección de la fragmentación del ADN espermático

Entre las técnicas para evaluar la fertilidad masculina, el **análisis de la fragmentación del ADN espermático** ha mostrado ser de gran interés en la última década, tanto por estar presente en un número elevado de pacientes infértiles como por la posibilidad de ofrecer un tratamiento (104). De hecho, la OMS ha incorporado el estudio de la fragmentación del ADN espermático a

la última versión de su manual de examen de muestras seminales (107). Para su estudio existen diferentes metodologías que se detallan a continuación.

1.4.2.1. Naranja de acridina y Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

En los años 70 se realizaron los primeros estudios sobre la fragmentación en el ADN espermático utilizando Naranja de acridina (AO, de sus siglas en inglés: *Acridine Orange*). En 1980, Evenson y col. describieron la primera técnica para detectar este daño, el *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), basándose en la mayor susceptibilidad de la cromatina a desnaturalizarse cuando contiene roturas (108,109). Para esta técnica se realiza una tinción con AO y se mide su fluorescencia con citometría de flujo: de color verde al unirse a un ADN íntegro y de color rojo al unirse a un ADN dañado (Figura 15). Esta técnica también permite detectar el número de células inmaduras (HDS, de sus siglas en inglés: *High DNA Stainability*) que contienen una proporción anormal de histonas o protaminas (108).

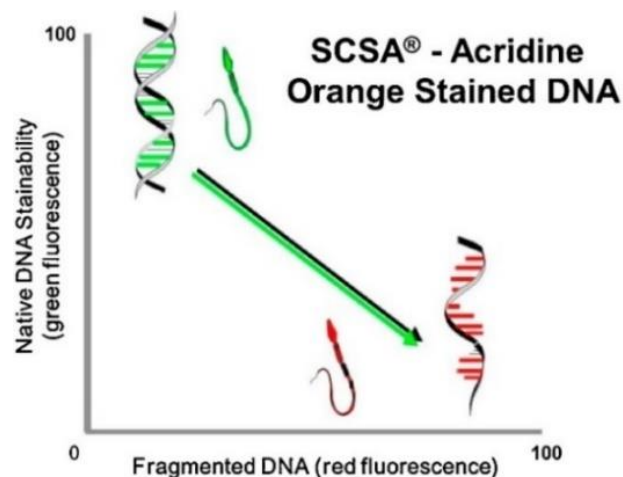


Figura 15. Cambio de fluorescencia del Naranja de acridina: verde cuando el ADN está íntegro en forma de cadena doble o rojo cuando está en forma de cadena sencilla en un ADN fragmentado. Figura de Evenson, 2016 (109).

1.4.2.2. Comet Assay

Durante los años 80-90 se desarrolló la metodología Comet, también llamada electroforesis en gel de célula única (SCGE, de sus siglas en inglés: *Single-Cell Gel Electrophoresis*). Esta técnica requiere una lisis de las membranas celulares y la descompactación de la cromatina seguida de una electroforesis. El campo eléctrico arrastra los extremos de ADN libres, con carga negativa, hacia el polo positivo generando una cola de forma similar a un cometa en cada célula. A mayor número de roturas, mayor longitud y densidad adquiere esta cola (108).

La principal ventaja de esta técnica es que permite determinar la magnitud del daño en el ADN en los espermatozoides de forma individual. Otra ventaja es la posibilidad de analizar por separado las roturas SSB y DSB aplicando diferentes pH del tampón de electroforesis (99).

Comet alcalino

A pH alcalino el test Comet permite la detección de roturas del tipo SSB puesto que, en estas condiciones, el ADN se desnaturaliza separando las dos hebras y permitiendo la migración de aquellos fragmentos generados por roturas en una sola de ellas (Figuras 16 y 17). Una electroforesis de cuatro minutos permite detectar SSB de forma mayoritaria (99). Ampliando el tiempo hasta 10-20 minutos (110) o cuando un número elevado de DSB están presentes en el ADN y generan fragmentos de pocas kilobases, esta técnica puede mostrar roturas DSB.

Comet neutro

En condiciones de pH neutro, el ADN permanece en forma de cadena doble y solamente se permite la migración de fragmentos cuando ambas cadenas presentan una rotura, es decir, cuando hay un DSB. En un estudio de 2013 se determinó que el Comet Neutro es la única técnica con suficiente sensibilidad para detectar roturas del tipo DSB de forma específica. Con 12,5 minutos de electroforesis se pueden detectar roturas localizadas en las regiones MAR o un daño extensivo en todo el genoma espermático (99) (Figuras 16 y 17).

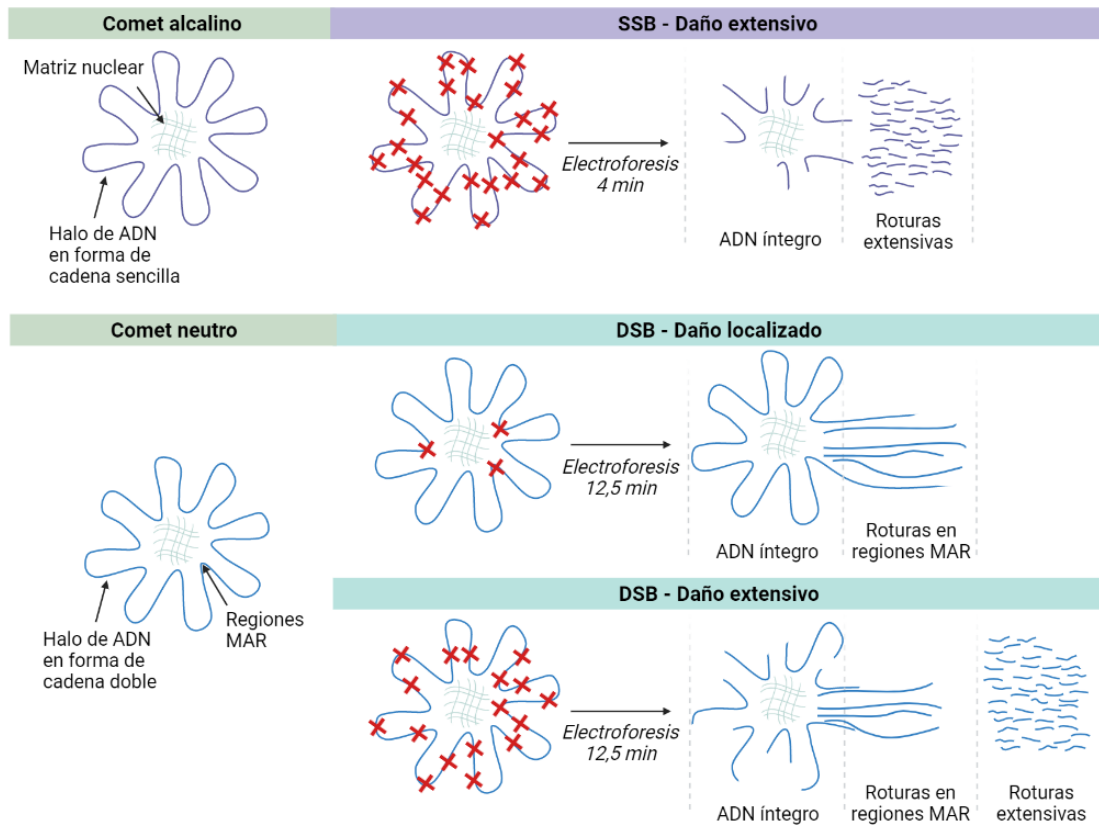


Figura 16. Detección de roturas de cadena sencilla (SSB) y de cadena doble (DSB) en el ADN espermático tras la realización de la técnica Comet a pH alcalino y neutro, respectivamente. En lila se muestra el ADN en forma de cadena sencilla tras un proceso de desnaturalización y, en azul, el ADN en forma de doble hélice. Las cruces rojas indican roturas en una o ambas cadenas de ADN.

	Normal (no fragmentado)	Alterado (fragmentado)	Alterado (degradado)
Comet alcalino (SSB)			
Comet neutro (DSB)		<i>Daño localizado en MAR</i> 	<i>Daño extensivo</i>

Figura 17. Imágenes de núcleos espermáticos tras realizar el test Comet alcalino y Comet neutro para la detección de roturas de cadena sencilla (SSB) y de cadena doble (DSB), respectivamente. Se muestran espermatozoides con ADN íntegro (normales) y con roturas (fragmentados o degradados).

1.4.2.3. TUNEL

La técnica TUNEL (de sus siglas en inglés: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*), desarrollada en los años 90, es un método de detección de la fragmentación del ADN ampliamente utilizado. Múltiples autores optan por su uso tanto en investigación como en diagnóstico gracias a la posibilidad de encontrar kits comerciales con un protocolo definido y a la posibilidad de tener un recuento manual con microscopía de epifluorescencia, o un recuento de un mayor número de células mediante el uso de citometría de flujo.

Esta técnica supone un método directo de detección ya que la encima desoxinucleotidil-transferasa marca los extremos de ADN libres con el nucleótido fluorescente dUTP. Según este procedimiento, tanto roturas SSB como DSB se pueden marcar. No obstante, el número de roturas de DSB es generalmente muy inferior al de SSB, por lo que la sensibilidad de la técnica TUNEL para detectar DSB es reducida y se puede asumir que permite obtener un resultado global de fragmentación que mayoritariamente representa los niveles de SSB (99).

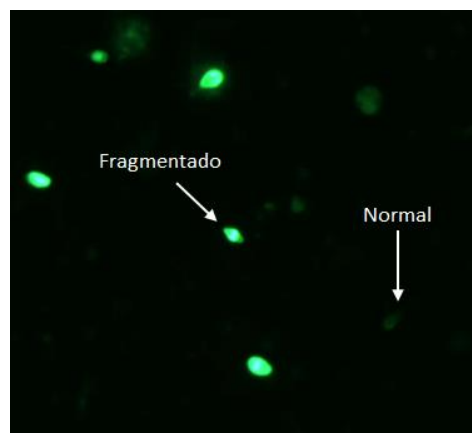


Figura 18. Imagen de espermatozoides tras la realización del test TUNEL para detectar fragmentación del ADN espermático. Están señalados un espermatozoide sin fluorescencia con ADN íntegro (normal) y un espermatozoide con fluorescencia verde (fragmentado).

1.4.2.4. Test de dispersión de la cromatina

En los años 2000 se describió la técnica de dispersión de la cromatina (SCD, de sus siglas en inglés: *Sperm Chromatin Dispersion*) (111). Tras un tratamiento desnaturalizante, una lisis celular y la retirada de protaminas, el ADN espermático forma bucles de dispersión. Las regiones MAR quedan unidas y se sitúan en el centro, mientras que los lazos toroidales quedan libres formando el halo. Cuando el ADN contiene roturas, la dispersión del ADN en la matriz de agarosa es tan elevada que no se produce un halo observable. En cambio, cuando la célula no contiene roturas, o contiene un número bajo de ellas, se observa un halo de mayor o menor diámetro.

De nuevo, debido a la diferencia entre el número de roturas de SSB y DSB, esta técnica permite detectar mayoritariamente SSB y muestra una baja capacidad de detección de DSB (99).



Figura 19. Imágenes de núcleos espermáticos tras el test de dispersión de la cromatina (SCD) para la detección mayoritaria de roturas de cadena sencilla. Se muestran espermatozoides normales (con halo de dispersión grande o mediano) y espermatozoides con roturas en su ADN (con halo pequeño o sin halo).

1.4.3. Comparación entre técnicas

Las técnicas que permiten la detección de roturas en el ADN espermático tienen diferentes ventajas e inconvenientes, así como diferentes estrategias para mostrar el daño. En 2013 se realizó un estudio comparativo de las cuatro técnicas más utilizadas actualmente (99). Los resultados mostraron que las técnicas Comet alcalino, SCD, TUNEL y SCSA permiten diferenciar poblaciones de varones fértiles e infértiles. Por el contrario, la técnica Comet neutro no permite esta diferenciación, pero sí detecta individuos con un mayor riesgo de aborto.

Como se ha mencionado, el Comet alcalino bajo las condiciones empleadas en este estudio (cuatro minutos de electroforesis), permite la detección mayoritaria de SSB. Las técnicas SCD, TUNEL y SCSA, debido a su metodología para señalar el daño, también permiten detectar, sobre todo, este tipo de daño y mostraron elevadas correlaciones con el Comet alcalino. El Comet neutro no mostró una correlación significativa con ninguna de las anteriores técnicas indicando que el tipo de daño detectado es diferente, en este caso, DSB (99).

1.5. Tratamientos para la infertilidad del varón

1.5.1. Tratamientos fisiológicos

Durante la evaluación de la fertilidad del varón se pueden detectar diferentes anomalías que pueden tratarse de forma fisiológica para revertir o mitigar la causa del daño.

De forma natural, el organismo genera agentes **antioxidantes** que deben mantenerse en balance con la presencia de ROS en el testículo. Cuando los niveles de ROS exceden la capacidad antioxidante natural, o cuando esta capacidad antioxidante se ve disminuida, se pueden encontrar niveles elevados de fragmentación del tipo SSB. Contra este daño oxidativo, existen numerosos tratamientos orales en el mercado basados en capacidades antioxidantes proporcionadas por sustancias como: las vitaminas B9, C y E, micronutrientes como el selenio y el zinc, la coenzima Q10, la L-carnitina o el licopeno, entre otros (112). El tratamiento con agentes antioxidantes administrados por vía oral ha mostrado ser capaz de reducir los niveles del daño oxidativo (52,113,114). También se ha estudiado su efecto sobre la fertilidad, mostrando un aumento significativo de las tasas de fecundación, implantación y embarazo clínico (115).

Una de las fuentes más frecuentes del incremento en el estrés oxidativo es la presencia de varicocele en los testículos. Cuando el varicocele tiene manifestaciones clínicas se puede tratar

quirúrgicamente mediante una **varicocelectomía**. El abordaje microquirúrgico ha mostrado una mejora significativa respecto al abordaje por laparoscopia ya que permite preservar las estructuras sanas del tejido mejorando significativamente los parámetros seminales y reduciendo los niveles de SSB tras nueve meses desde la operación (116).

Cuando los niveles de estrés oxidativo son elevados debido a la presencia de leucocitos por una infección, se puede administrar **antibióticos** al paciente.

1.5.2. Tratamientos sobre la muestra seminal en reproducción asistida

Cuando el tratamiento oral no es posible o no ha tenido el efecto deseado, o cuando el varón opta por tratamientos de fecundación *in vitro* por otras razones, se pueden utilizar técnicas de selección espermática que permiten separar espermatozoides sanos de los alterados.

Una de las consideraciones primordiales durante el tratamiento de las muestras de eyaculado es tratar de minimizar el **daño iatrogénico**. Se recomienda procesar las muestras lentamente, realizar cambios de forma gradual (mezcla con medios o cambios de temperatura), minimizar los pasos de centrifugación o realizar centrifugaciones a bajas revoluciones.

1.5.2.1. Selección espermática basada en la movilidad

Existen diferentes técnicas basadas en la selección por motilidad como el **Swim-up** (traducido del inglés “nadar hacia arriba”) (Figura 20). Este procedimiento implica la centrifugación de la muestra de eyaculado para separar la fracción celular del sobrenadante que contiene el líquido seminal. Se resuspende la fracción celular y se añade muy lentamente un medio adecuado para la supervivencia de los espermatozoides con una inclinación de 45°. Tras una incubación a 37°C, se recoge la fracción superior del medio, que debe contener solamente espermatozoides que han conseguido nadar hacia arriba desde la parte inferior del tubo. Otra técnica son los **Gradientes de densidad**, donde se utilizan dos capas de un material coloidal a diferentes

concentraciones. Tras centrifugar el tubo se obtienen espermatozoides móviles con una densidad normal en la capa inferior ya que el resto quedan retenidos (Figura 20).

Estas técnicas han mostrado reducir significativamente los niveles de SSB en numerosos estudios utilizando técnicas como el SCD (117). No obstante, otros estudios muestran que, debido al proceso de centrifugación, estos procesos pueden generar daño iatrogénico (118).

1.5.2.2. Otros sistemas de selección espermática

Puesto que el daño oxidativo se genera sobre todo durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo (daño post-testicular), la recuperación de espermatozoides directamente del testículo (**TESE**, de sus siglas en inglés: *Testicular Sperm Extraction*) es una estrategia a la que se puede recurrir en reproducción asistida. De forma coherente con la posible reducción de los niveles de SSB, esta estrategia ha mostrado aumentar las tasas de embarazo en pacientes con ciclos fallidos utilizando espermatozoides eyaculados (67).

La separación magnética con columnas de Anexina V (**MACS**, de sus siglas en inglés *Magnetic Activated Cell Sorting*) consiste en la separación de espermatozoides pre-apoptóticos que expresan fosfatidilserina en su membrana. Se incubaba la muestra con microesferas metálicas unidas a Anexina V, que tienen una elevada afinidad por la fosfatidilserina. De este modo, tras pasar la muestra por una columna que genera un campo magnético, quedan retenidos los espermatozoides pre-apoptóticos y solo quedan libres aquellos espermatozoides sanos.

Recientemente, han aparecido dispositivos **microfluídicos** para la selección espermática. Estos dispositivos mimetizan el tipo de obstáculos que los espermatozoides se encontrarían en el tracto reproductor femenino hasta llegar al ovocito. En un estudio de 2018, Quinn y col. mostraron que el **dispositivo ZyMöt™ICSI** (anteriormente llamado FertileChip®) (Figura 20) tiene una mayor capacidad de reducción de los niveles de fragmentación del ADN espermático

comparado con sistemas de selección tradicionales como los Gradientes de densidad (119). No obstante, este estudio analizó los niveles de fragmentación mediante las técnicas SCD y TUNEL, que mayoritariamente detectan SSB. En un estudio reciente de Pujol y col. (120) se ha observado que este dispositivo es capaz de reducir los valores de DSB de forma significativa mediante su estudio con la técnica Comet.

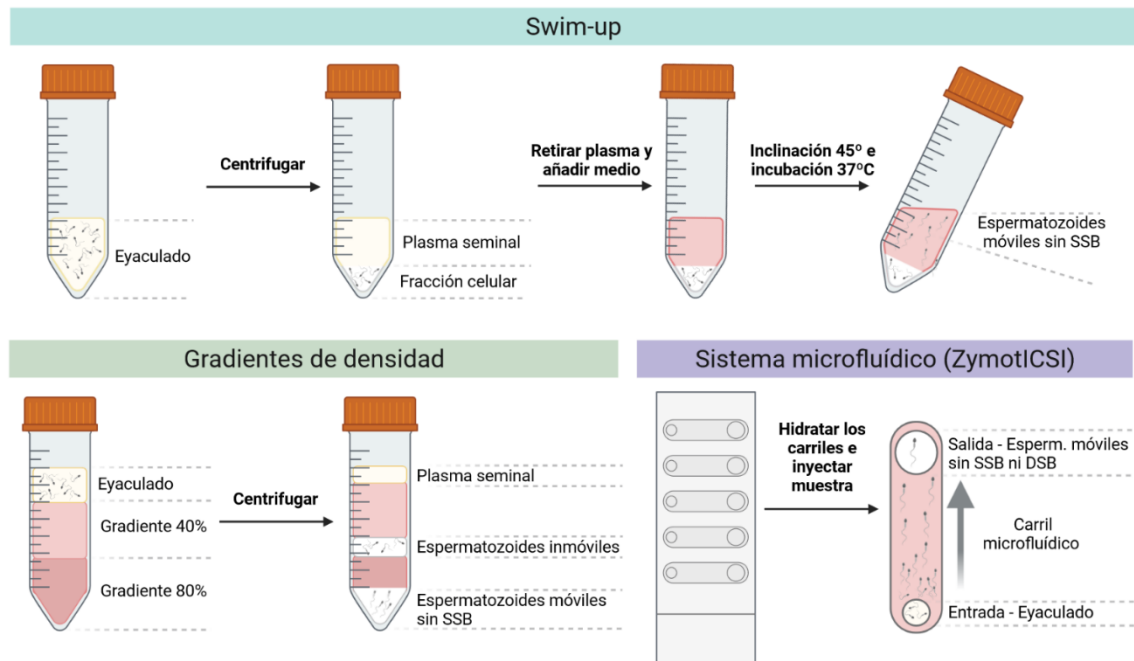


Figura 20. Métodos de selección espermática: Swim-up; Gradientes de densidad y sistema ZymotTMICSI †.

1.5.3. Tratamientos de reproducción asistida

Los **tratamientos de reproducción asistida** (TRA) son el conjunto de técnicas médicas y procedimientos de laboratorio que pretenden conseguir la fecundación de forma artificial con el fin conseguir un embarazo evolutivo y el nacimiento de un niño vivo sano.

Según los últimos informes oficiales de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), el número de ciclos de reproducción asistida se mantiene en aumento: se realizaron un total de 166.712 en 2015, número que aumentó hasta 180.713 ciclos en el año 2019 (121,122). En todo Europa, se realizaron 940.503 ciclos solamente en el año 2017 (123). La mayoría de los pacientes recurren

a estos tratamientos tras enfrentarse a problemas para concebir de forma natural. No obstante, otras razones pueden llevar al uso de TRA, como puede ser la necesidad de evitar la transmisión de un gen perjudicial para la salud del descendiente o el deseo de una paternidad/maternidad monoparental o en parejas homosexuales.

Los TRA disponibles actualmente son la **Inseminación Artificial** (IA) y los tratamientos *in vitro* como la **Fecundación *In Vitro* convencional** (FIV) o la **Inyección intracitoplasmática de espermatozoides** (ICSI, de sus siglas en inglés *Intracytoplasmic Sperm Injection*). Según el último informe de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) en 2019, el 18,0% de los TRA fueron tratamientos de IA mientras que el 82,0% fueron *in vitro* (12,7% FIV y 87,3% ICSI) (122).

1.5.3.1. *Inseminación artificial*

La IA es el procedimiento de reproducción asistida más sencillo y menos invasivo. Esta técnica consiste en una estimulación ovárica de la mujer controlada para asegurar el día óptimo para la fecundación; la recogida de la muestra de semen y su preparación en el laboratorio para recuperar espermatozoides móviles y, finalmente, la introducción de estos espermatozoides mediante una cánula en la cavidad uterina de la mujer. En este caso, la fecundación del ovocito se produce de forma natural en la trompa de Falopio.

Este procedimiento está indicado cuando existe i) infertilidad femenina por la presencia de un factor cervical, endometriosis o ciclos anovulatorios o ii) cuando existe infertilidad masculina por la imposibilidad de depositar el semen en el tracto reproductor femenino por falta de erección o eyaculación retrógrada o cuando se observan parámetros seminales levemente alterados.

1.5.3.2. Fecundación *in vitro* convencional

En 1978 nació la primera persona fruto de un tratamiento de FIV. Este procedimiento tiene una mayor complejidad que la IA debido a que ambos gametos deben extraerse y ser fecundados en el laboratorio para luego ser transferidos a la madre gestante.

En este caso, es necesario realizar una hiperestimulación controlada para poder recuperar un mayor número de ovocitos maduros mediante una punción ovárica. El semen se recoge por masturbación y se prepara en el laboratorio mediante diferentes técnicas de selección espermática como la recuperación de espermatozoides móviles, el Swim-up o los Gradientes de densidad. En una placa de laboratorio se pone una gota que contiene un único ovocito maduro y miles de espermatozoides con el objetivo de que uno de ellos pueda fecundarlo. Tras cultivar los embriones obtenidos hasta el día +3 o +5 p.c. se realiza la transferencia de un embrión al útero materno. El resto de embriones se pueden criopreservar para su futuro uso.

La FIV está indicada i) en casos en los que la IA no ha tenido éxito; ii) en casos de infertilidad femenina por un factor tubárico, uterino o cervical o iii) cuando existe infertilidad masculina al encontrar parámetros seminales alterados.

1.5.3.3. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

La microinyección de espermatozoides directamente en el ovocito es la técnica de reproducción asistida *in vitro* más compleja e invasiva. Se concibió en 1992 por parte de Palermo y col. para dar una solución a problemas de fertilidad masculinos severos (124). No obstante, debido a que el proceso es altamente programable, su uso está muy extendido por los laboratorios de reproducción (123,125).

Igual que en el tratamiento por FIV, el proceso se inicia con la hiperestimulación ovárica de la paciente y la recolección del semen del varón, que se prepara en el laboratorio mediante

técnicas de selección espermática. La diferencia primordial entre los dos procedimientos *in vitro* es que, durante la ICSI se **seleccionan espermatozoides** morfológicamente normales y de buena motilidad mediante microscopía. Luego, cada espermatozoide seleccionado se **microinyecta** dentro de un ovocito maduro generando una fecundación artificial (124).

La indicación para recurrir a un tratamiento de ICSI es principalmente la presencia de un factor masculino severo como puede ser: azoospermia obstructiva (ausencia de espermatozoides en el eyaculado por una obstrucción en los canales); oligozoospermia (bajo recuento de espermatozoides); astenoospermia (movilidad reducida de los espermatozoides); teratoospermia (morfología alterada de los espermatozoides); combinaciones de alteraciones en los parámetros seminales; enfermedades infecciosas transmisibles (VIH, VHB, VHC, etc). En cuanto a las indicaciones por factor femenino encontramos la baja reserva ovárica. También, como combinación de los factores femeninos y masculinos, la ICSI está indicada en casos de infertilidad idiopática en los que otros TRA han fallado de forma repetida.

1.5.4. Test genético preimplantacional

Tras la realización de tratamientos de reproducción *in vitro*, se pueden realizar un estudio de las alteraciones genéticas de los embriones obtenidos. El **Test genético preimplantacional** (PGT, de sus siglas en inglés *Preimplantational Genetic Testing*) puede evaluar la presencia de un número incorrecto de cromosomas (**PGT-Aneuploidías**); detectar la presencia de una alteración o mutación en un gen concreto relacionada con una enfermedad monogénica (**PGT-Monogénicas**) o detectar alteraciones estructurales como translocaciones, duplicaciones o inserciones (**PGT-Estructurales**) (126,127).

Tras el análisis de los embriones obtenidos por PGT, solamente se transfieren a la madre gestante aquellos que han presentado euploidía. De esta forma, se han conseguido reducir las tasas de aborto debido a la presencia de alteraciones genéticas en el embrión. No obstante, este

procedimiento requiere la biopsia o extracción de células del embrión y la criopreservación de éste hasta tener el diagnóstico y se decida transferirlo. Estos procesos conllevan un riesgo de pérdida de la viabilidad del embrión.

1.5.5. Donación de gametos o embriones

Todos los TRA pueden llevarse a cabo utilizando los propios gametos de los pacientes. No obstante, se puede recurrir a la donación si uno de los progenitores no produce gametos sanos o si no existe una pareja reproductiva. Mientras que en los procedimientos de IA solo se podría recurrir a la donación de semen, en tratamientos *in vitro* (FIV e ICSI) tanto ovocitos como espermatozoides, e incluso embriones ya formados, pueden ser donados.

Aunque la selección del donante se realiza en base a criterios de semejanza física y de compatibilidad inmunológica con los receptores, esta práctica supone la pérdida de la herencia genética del/la paciente. Pese a que esta puede ser la única opción para algunos pacientes de conseguir un embarazo y un niño nacido sano, conlleva una carga emocional que también debe ser valorada y atendida por los profesionales médicos.

Las indicaciones para la donación incluyen: edad materna avanzada; baja reserva ovárica; mala calidad ovocitaria o de los espermatozoides; fallos repetidos utilizando TRA con gametos propios; abortos de repetición; la necesidad de evitar la transmisión de un genotipo patológico o la necesidad de un donante por deseo de concepción monoparental o en parejas homosexuales.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La fragmentación del ADN espermático ha mostrado tener un efecto perjudicial en la fertilidad masculina. Sin embargo, los últimos meta-análisis concluyen que no se ha podido demostrar que la evaluación de este parámetro en la muestra seminal pueda ser predictivo del resultado de un ciclo de reproducción asistida mediante la técnica ICSI.

Durante estos tratamientos el eyaculado se manipula de dos formas: primero se prepara la muestra, habitualmente para descartar espermatozoides muertos o inmóviles, y luego se microseleccionan espermatozoides con morfología y motilidad óptimas para ser inyectados en los ovocitos. En la presente Tesis Doctoral se plantea la posibilidad de que la preparación de la muestra y la selección de espermatozoides puedan introducir un sesgo diagnóstico. En ese caso, los valores de fragmentación analizados sobre la muestra de eyaculado en su conjunto no serían representativos de la pequeña subpoblación de espermatozoides finalmente inyectados. La existencia de este sesgo en el diagnóstico podría explicar la falta de asociación entre los valores de fragmentación del ADN espermático y los resultados de los ciclos de ICSI.

Además, la distinción entre los dos tipos de fragmentación (SSB y DSB) podría ser de vital importancia al analizar este sesgo diagnóstico. Debido a la relación existente entre el estrés oxidativo, la motilidad de los espermatozoides y las roturas del tipo SSB, aquellos métodos de selección por motilidad podrían ser capaces de reducir los niveles de este tipo de fragmentación. Por el contrario, estos métodos de selección no serían capaces de reducir los valores de DSB puesto que no hay evidencia de una relación entre la motilidad de los espermatozoides y los niveles de estas roturas. De confirmarse esta distinción, la aplicación de un sistema de selección eficaz para reducir ambos tipos de roturas podría ser de gran utilidad en tratamientos de ICSI.

2.2. Objetivos

El **primer objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral es detectar un posible sesgo al analizar la fragmentación del ADN en muestras seminales respecto al daño existente en espermatozoides usados en ciclos de ICSI. De confirmarse este sesgo, el **segundo objetivo principal** es estudiar el efecto de las roturas en el ADN espermático sobre los resultados reproductivos en ciclos de ICSI, así como evaluar el potencial beneficio del uso de técnicas de selección espermática.

Para la consecución de los objetivos principales se han establecido los siguientes **proyectos**:

- **Proyecto 1:** Estudio multimetodológico de la fragmentación en el ADN (SSB y DSB) en espermatozoides microseleccionados en comparación con el daño encontrado en el eyaculado y en muestras tras realizar un Swim-up. Este proyecto se divide en:
 - **Proyecto 1.1:** Adaptación de las técnicas Comet neutro, Comet alcalino, SCD y TUNEL para estudiar espermatozoides seleccionados siguiendo criterios de ICSI (ICSI-Seleccionados; ICSI-S) y espermatozoides descartados (ICSI-Negativos; ICSI-N).
 - **Proyecto 1.2:** Estudio comparativo de la fragmentación en el ADN (SSB y DSB) en muestras de eyaculado, Swim-up e ICSI-S.
 - **Proyecto 1.3:** Estudio de la fragmentación en el ADN (SSB y DSB) en ICSI-N.
- **Proyecto 2:** Determinación del efecto de la fragmentación del ADN espermático (SSB y DSB) sobre las tasas de fecundación y euploidía en ciclos de ICSI. En este proyecto también se estudia el efecto de un dispositivo microfluídico para la selección de espermatozoides sobre estas tasas.
- **Proyecto 3:** Estudio del efecto de la selección espermática mediante un dispositivo microfluídico en los resultados clínicos de ciclos de ICSI en pacientes con valores elevados de DSB.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Procesamiento de muestras de semen

3.1.1. Procedencia de las muestras, consentimiento informado y comité de ética

Los estudios realizados en la presente tesis doctoral se han basado en el análisis de muestras de semen procedentes de pacientes infértiles. Las muestras de estos pacientes fueron recogidas en diferentes centros, según el proyecto: Proyecto 1) en el centro CIMAB (Sant Quirze del Vallés; Barcelona); Proyecto 2) en la clínica de reproducción UEG (Vic y Manresa; Barcelona); y Proyecto 3) en la clínica de reproducción Ginefiv (Madrid; Madrid).

Todos los pacientes fueron informados sobre los proyectos de investigación en los que se incluirían y firmaron los **consentimientos informados** correspondientes en cada centro de reclutamiento. En ningún caso, la inclusión de los participantes en los estudios realizados, supuso una interferencia con los procedimientos diagnósticos o de reproducción que pudieran requerir los pacientes. Se adjuntan las plantillas de los consentimientos informados en cada centro en el Anexo.

Todos los proyectos fueron aprobados por el **comité de ética** de la Corporació Sanitària Parc Taulí (Sabadell; Barcelona) bajo el marco del estudio de la fragmentación del ADN espermático y su relación con la infertilidad masculina (Referencia: 2017902).

3.1.2. Grupos de pacientes

En el **Proyecto 1.2** se incluyeron un total de 23 pacientes infértiles de forma prospectiva. Estos varones acudieron al centro CIMAB para realizar un estudio diagnóstico de fragmentación del ADN espermático tras, al menos, un año de infertilidad idiopática. De cada paciente se analizó la muestra completa de **eyaculado**, una muestra tras la realización de un **Swim-up** y espermatozoides **ICSI-S** con cuatro técnicas de detección de fragmentación del ADN espermático (Comet neutro, Comet alcalino, SCD y TUNEL).

Además, en este estudio se dividieron los pacientes en dos grupos: i) parejas que nunca habían conseguido un embarazo de forma natural o que habían tenido fallos de implantación repetidos en TRA y ii) parejas que habían tenido abortos de repetición consecutivos (≥ 2 abortos) de forma natural o tras realizar TRA.

En el **Proyecto 1.3** se incluyeron un total de cinco pacientes infértiles de forma prospectiva para analizar espermatozoides **ICSI-N**. Sobre estos pacientes también se analizó la muestra de **eyaculado**, una muestra tras realizar un **Swim-up** y espermatozoides **ICSI-S**. Los ICSI-N se dividieron en grupos atendiendo a las anomalías que presentaban: i) ICSI-N con morfología de la cabeza alterada pero móviles; ii) ICSI-N con la pieza intermedia alterada pero móviles y iii) ICSI-N con morfología normal pero inmóviles. En este caso, las muestras se analizaron mediante los test Comet neutro y Comet alcalino.

En el **Proyecto 2** se incluyeron de forma retrospectiva un total de 167 ciclos de ICSI de parejas infértiles que realizaron ciclos de ICSI en la clínica UEG. En todos los casos se había medido la fragmentación del ADN espermático (SSB y DSB) en el laboratorio CIMAB mediante las técnicas Comet. Se dividieron los ciclos atendiendo a los valores de SSB y DSB, así como por la edad materna y según la técnica de selección espermática utilizada para comparar las **tasas de fecundación y de euploidía**.

En el **Proyecto 3** se incluyeron 28 parejas que realizaron un primer ciclo de ICSI fallido utilizando métodos convencionales para la selección espermática. Tras estos tratamientos, la clínica Ginefiv consideró la realización del test Comet en el centro CIMAB para diagnosticar a los varones y se detectaron valores alterados de DSB. Con este diagnóstico, las parejas realizaron un segundo ciclo de ICSI utilizando el dispositivo microfluídico ZyMöt™ICSI (anteriormente llamado FertileChip®; DxNow Inc., MD, EEUU) para filtrar el eyaculado. Se compararon los **resultados clínicos** de estos ciclos de forma retrospectiva.

Se **excluyeron** de los estudios aquellos pacientes con alteraciones severas en el seminograma que impedían la selección espermática para ICSI. También se excluyeron aquellos casos en los que otro factor conocido pudiera explicar la infertilidad de esa pareja, ya fuera un factor masculino (varicocele, alteraciones hormonales, infecciones genitourinarias o alteraciones en el cariotipo) o un factor femenino (factor tubárico, alteraciones hormonales, ovario poliquístico, endometriosis o alteraciones en el cariotipo).

3.1.3. Obtención de las muestras

Todas las muestras seminales analizadas se obtuvieron por masturbación tras un periodo de abstinencia eyaculatoria de 2-5 días en los centros CIMAB, UEG y Ginefiv, según el proyecto. Las recogidas se realizaron en contenedores estériles y se analizaron siguiendo las recomendaciones de la quinta edición del manual de “Examen y procesamiento de semen humano” emitido por la OMS (103).

Las muestras utilizadas en el Proyecto 1 se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su licuefacción y se analizaron en fresco. Para la consecución de los Proyectos 2 y 3, una primera muestra del paciente se criopreservó en cada centro siguiendo protocolos internos para su análisis de fragmentación en CIMAB y una segunda muestra se utilizó para el ciclo de ICSI.

3.1.4. Análisis de seminograma

Se realizó un análisis de seminograma de cada muestra incluida en los estudios, ya fuera en el centro CIMAB o en los centros colaboradores.

En el seminograma se incluyó el análisis de las propiedades macroscópicas (volumen, licuefacción, color y pH) y las propiedades microscópicas (concentración de espermatozoides, morfología y movilidad). Se utilizó el programa *Sperm Class Analyzer (SCA)* (Microptic; España).

Los valores de normalidad se tomaron de la quinta edición del Manual de examen y procesamiento de semen humano de la OMS (103) (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de referencia para los distintos parámetros seminales. Adaptado de (103).

Parámetro del seminograma	Valor mínimo de normalidad
Volumen (mL)	1,5
pH	7,2
Número total de espermatozoides ($\times 10^6$)	39
Concentración de espermatozoides ($10^6/\text{mL}$)	15
Movilidad progresiva (%)	32
Movilidad total (%)	40
Vitalidad (%)	58
Formas normales (%)	4

3.2. Métodos de preparación de la muestra seminal

Durante la preparación de las muestras seminales para el **Proyecto 1** y durante los TRA en los **Proyectos 2 y 3** se utilizaron métodos convencionales de selección espermática con el objetivo de separar la fracción celular del líquido seminal y de eliminar espermatozoides muertos o inmóviles. En este grupo de técnicas se incluyen el Swim-up y los Gradientes de densidad. También se utilizó el método de filtración microfluídico ZyMöt™ICSI.

3.2.1. Swim-up

Se realizó un lavado de las muestras añadiendo lentamente medio HAM F10 a 37°C. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 100g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la fracción celular. Se añadió lentamente 1-2mL de medio, según la calidad seminal, con una inclinación de 45° y se incubó el tubo durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se recogieron 50-100µL de la fracción superior y se depositaron en un nuevo tubo (Figura 20).

3.2.2. Gradientes de densidad

Se prepararon dos fases del medio *Sperm Grad* (Vitrolife; Suecia) a una concentración del 80% y del 40% diluida en medio IVF (Vitrolife; Suecia) en un tubo Falcon. Se realizó una primera centrifugación a 100g durante 20 minutos. La fracción celular se resuspendió en 0,7mL de medio IVF y se realizó una segunda centrifugación a 150g durante 5 minutos. Finalmente, la fracción celular se resuspendió en 150-300µL de medio IVF (Figura 20).

3.2.3. Selección microfluídica (ZyMöt™ICSI)

Se hidrataron los cinco canales microfluídicos con 13µL de medio *Sperm Washing Medium* (Fujifilm, Irvine Scientific; EEUU) o medio IVF. Por el pocillo de entrada, se inyectaron lentamente 1-2,5µL de la muestra seminal tras licuar y se sellaron los pocillos con aceite mineral. En este punto es importante asegurar que la inyección de la muestra no ha sobrepasado la línea central del dispositivo y que ningún espermatozoide ha llegado al pocillo de salida. Se incubó el dispositivo a 37°C durante 15-30 minutos, hasta que se observaron espermatozoides en el pocillo de salida. Tras la incubación, se recogieron 2-3µL de cada pocillo de salida, obteniendo un total de 10-15µL de muestra (Figura 20).

3.3. Selección espermática para ICSI

Tras la preparación de las muestras se realizó la selección espermática para ICSI siguiendo los criterios de morfología normal y motilidad progresiva (ICSI-S) o con alteraciones (ICSI-N) (124).

En el **Proyecto 1**, los espermatozoides seleccionados se analizaron con cuatro técnicas para la determinación de la fragmentación del ADN espermático. En los **Proyectos 2 y 3**, los ICSI-S se utilizaron para microinyectar ovocitos en ciclos de ICSI de parejas infértiles.

Para la selección espermática en el **Proyecto 1** se utilizó un microscopio invertido acoplado a un sistema de micromanipulación (microscopio Nikon Diaphot y sistema Narishigue, Nikon Inc.;

Japón). Se preparó una placa de ICSI con una gota alargada de 5 μ L y cinco gotas de 1 μ L de polivinilpirrolidón (PVP) al 10% (Origio; Dinamarca). Se cubrieron las gotas con aceite mineral y se mantuvo a 37°C hasta su uso. Tras la preparación espermática por Swim-up, se inyectó 1 μ L de muestra en un extremo de la gota de 5 μ L de PVP (Figura 21). Para la selección espermática, se valoró la morfología y la motilidad de los espermatozoides y se aspiraron los que cumplían los requisitos de normalidad (ICSI-S) tras su paralización presionando la cola con la micropipeta. Finalmente, se dejaron los ICSI-S en una gota limpia de PVP hasta acumular grupos de entre 10-20 células. La selección de ICSI-N siguió el mismo procedimiento, pero solamente se seleccionaron aquellos espermatozoides que presentaban anomalías.

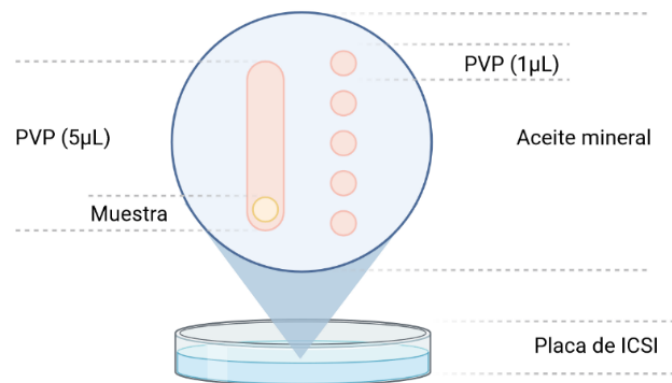


Figura 21. Representación de la placa de ICSI utilizada para la microselección de espermatozoides †.

La selección de espermatozoides para su uso en ciclos de reproducción asistida en los **Proyectos 2 y 3** presentó algunas variaciones en cuanto al instrumental, aparatos y medios utilizados según el centro, pero siguió el mismo proceso de selección y mantuvo los criterios de selección de espermatozoides con morfología normal y motilidad progresiva.

3.4. Determinación de la fragmentación del ADN espermático

En el **Proyecto 1**, la fragmentación del ADN espermático se analizó mediante cuatro técnicas distintas (Comet Neutro, Comet Alcalino, SCD y TUNEL). Las muestras de eyaculado y tras el

Swim-up se analizaron siguiendo los **protocolos convencionales** de estas técnicas. Para poder analizar los ICSI-S e ICSI-N se realizaron **adaptaciones** procedimentales de cada técnica. En los **Proyectos 2 y 3**, la fragmentación del ADN espermático se analizó mediante el test Comet con el protocolo convencional.

3.4.1. Análisis de la fragmentación sobre la muestra seminal y de Swim-up

3.4.1.1. Comet assay

Preparación de las muestras

Las muestras seminales se lavaron dos veces en PBS 1x (0,13M NaCl, 2,7mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄; pH 7,5), descartando el sobrenadante y resuspendiendo la fracción celular hasta una concentración de $1 \cdot 10^6$ espermatozoides/mL. Las muestras se mezclaron con agarosa de bajo punto de gelificación al 1% en una proporción 1:2 (v/v). Se colocaron 5µL de la mezcla en un portaobjetos pretratado con una capa de agarosa y se cubrieron con un cubreobjetos. Se dejó gelificar los geles a 4°C en la nevera y se retiraron los cubreobjetos evitando romper el gel. Para cada muestra se prepararon dos portaobjetos destinados a las versiones neutra y alcalina del test Comet.

Lisis celular

Se sumergieron los portaobjetos en las soluciones de lisis 1 y 2 durante 30 minutos cada una. La solución de lisis 1 (0,4M Tris-HCl, 0,8M DTT (ditiotreitól), 1% SDS (dodecil sulfato de sodio); pH 7,5) permite la degradación de las membranas del espermatozoide y rompe los puentes disulfuro existentes entre las protaminas. La solución de lisis 2 (0,4M Tris-HCl, 0,4M DTT, 2M NaCl, 50mM EDTA; pH 7,5) permite separar las protaminas e histonas unidas al ADN que genera una dispersión de la cromatina en forma de halo. Se realizó un lavado en TBE 1x (89mM Tris-HCl, 89mM H₃BO₃, 20mM EDTA (Ácido etilendiaminotetra-acético); pH 8,5) durante 2 minutos para preparar el gel para la electroforesis.

Electroforesis y migración de fragmentos

Para la determinación de las roturas del tipo DSB, la electroforesis se realizó a pH neutro en un tampón TBE 1x a 20V (1V/cm) durante 12,5 minutos. Después se sumergió el portaobjetos en una solución de 0,9% NaCl durante 2 minutos.

Para la determinación de las roturas del tipo SSB, se realizó un tratamiento desnaturalizante para separar las hebras de ADN en una solución alcalina (0,03M NaOH, 0,15M NaCl; pH 12) a 4°C durante 2,5 minutos. Después se realizó la electroforesis en un tampón alcalino (0,03M NaOH; pH 12,2) a 20V (1V/cm) durante 4 minutos.

Lavados y deshidratación

Tras los procesos de electroforesis ambos portaobjetos se sumergieron en una solución de neutralización (0,4M Tris-HCl; pH 8,5) durante 5 minutos. Finalmente, se realizó una deshidratación de los geles sumergiendo los portaobjetos en una serie de concentraciones crecientes de etanol (70%, 90% y 100% durante 2 minutos cada uno). Los portaobjetos se dejaron secar horizontalmente.

Análisis mediante microscopía de fluorescencia

La evaluación de los espermatozoides se realizó tras la tinción del ADN con un agente intercalante (SlowFade Diamond Antifade Mountant with DAPI, CA, EEUU) que se distribuyó por los geles con un cubreobjetos.

Se valoró la intensidad del daño SSB y DSB clasificando los espermatozoides siguiendo los criterios descritos en la Figura 17. Se hizo el recuento de 200 espermatozoides.

3.4.1.2. Test de dispersión de la cromatina

Preparación de las muestras

Igual que en la preparación para el test Comet, para el test SCD las muestras se lavaron en PBS 1x, se mezclaron con agarosa al 1% y se colocaron 5µL sobre un portaobjetos pretratado con agarosa. Se mantuvo el portaobjetos a 4°C durante 5 minutos para gelificar la agarosa.

Formación del halo

El portaobjeto se sumergió en una solución desnaturalizante (0,1N HCl) durante 7 minutos. Seguidamente, se sumergió el portaobjetos en las soluciones de lisis 1 y 2 anteriormente descritas durante 30 minutos cada una.

Lavado y deshidratación

Tras las lisis, se realizó un lavado en solución de neutralización y se deshidrataron los geles en concentraciones crecientes de etanol.

Análisis mediante microscopía de fluorescencia

La evaluación los espermatozoides se realizó tras la tinción del ADN con un agente intercalante. Se valoró la intensidad del daño SSB en los espermatozoides según el diámetro del halo obtenido (Figura 19). Se hizo el recuento de 200 espermatozoides.

3.4.1.3. TUNEL assay

Para la técnica TUNEL se utilizó el kit comercial de detección directa del daño *In situ cell death detection* (Roche; Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de las muestras

Las muestras se lavaron con PBS 1x y se separó la fracción celular. Se realizaron dos lavados con solución de Carnoy recién preparada (ácido acético y metanol, 1:3 v/v). Se mantuvo en solución de Carnoy durante 24h y se hizo un último lavado en solución recién preparada hasta ajustar a la concentración deseada. Se dejó caer una gota de la muestra sobre un portaobjetos de cristal

previamente desengrasado en metanol a una distancia aproximada de 2cm para formar una extensión celular. Se dejó secar el portaobjetos a temperatura ambiente durante, al menos, 30 minutos. Los portaobjetos se mantuvieron a -20°C hasta la realización del test.

Controles positivo y negativo

En cada experimento se añadió un control positivo: muestra de eyaculado tratada con enzima DNAsa 2000U/ μ L (*deoxyribonuclease I from bovine pancreas*) incubada a 37°C durante 30 minutos para inducir roturas en el ADN; y un control negativo: muestra de eyaculado no tratada con la enzima TdT (de sus siglas en inglés: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase).

Reacción de marcaje y lavados

A partir de este momento se trabajó en oscuridad. En la muestra problema y el control positivo se añadieron 5 μ L de una mezcla del enzima TdT y la solución de marcaje en proporción 1:9 (v/v) y se cubrió con un cubreobjetos de parafilm. Se incubaron los portaobjetos en una cámara húmeda a 37°C durante 1h. Se retiraron los cubreobjetos y se realizaron tres lavados de 10 minutos en agua miliQ. Se dejaron secar los portaobjetos a temperatura ambiente.

Análisis mediante microscopía de fluorescencia

Se tiñeron las muestras con un agente intercalante para marcar los núcleos. Se hizo un recuento de 200 espermatozoides anotando el número de células con fluorescencia verde que indica la presencia de roturas en el ADN (Figura 18).

3.4.2. Adaptaciones para el estudio de espermatozoides seleccionados

En el **Proyecto 1.1** se adaptaron las técnicas de análisis de la fragmentación del ADN espermático para poder estudiar ICSI-S e ICSI-N en los Proyectos 1.2 y 1.3.

3.4.2.1. Adaptaciones para fijaciones en matriz de agarosa

Para las técnicas en las que los espermatozoides se fijan en una matriz de agarosa (Comet neutro, Comet alcalino y SCD), se tuvo en cuenta el volumen de la gota, la necesidad de

homogeneización de la agarosa, la temperatura de gelificación y la necesidad de cubrir la gota con un cubreobjetos para repartir el volumen en un gel plano. El protocolo adaptado para fijaciones en matriz de agarosa surgió tras la consecución del Proyecto 1.1 se describe a continuación.

Primero se seleccionaron los espermatozoides y se agruparon en gotas limpias de PVP. Después, con una micropipeta de inyección para ICSI, se aspiraron grupos de 10-20 espermatozoides dejando el mínimo volumen de medio entre cada célula. Rápidamente, se retiró la placa de trabajo (Figura 21) y se colocó un portaobjetos pretratado con agarosa y atemperado a 37°C en la platina del microscopio. Rápidamente, se colocó una gota de 1µL de agarosa licuada sobre el portaobjetos y se inyectaron los 10-20 espermatozoides en el centro de la gota. Los espermatozoides se dejaron con suficiente separación entre ellos para no interferir, posteriormente, en la formación de las colas del ensayo Comet y los halos del test SCD. Se puso el portaobjetos en contacto con el vórtex durante 5 segundos a velocidad mínima para homogeneizar la gota. Se dejó gelificar la agarosa a temperatura ambiente durante 5 minutos y, finalmente, se inició el protocolo correspondiente.

3.4.2.2. Adaptaciones para fijaciones en Carnoy

Para la técnica TUNEL, con espermatozoides fijados directamente en el portaobjetos tras un tratamiento con solución de Carnoy, se tuvo en cuenta el tipo de medio de la gota inicial de inyección; el volumen de la gota y el tiempo de fijación. El protocolo adaptado para fijaciones en Carnoy se describe a continuación.

Primero se seleccionaron los espermatozoides y se agruparon en gotas limpias de PVP. Después se aspiraron grupos de 10-20 espermatozoides individualmente dejando el mínimo volumen de medio entre ellos. Rápidamente, se retiró la placa de trabajo y se colocó un portaobjetos previamente desengrasado en metanol en la platina del microscopio. Se colocó una gota de 1µL

agua miliQ sobre el portaobjetos y se inyectaron los 10-20 espermatozoides en el centro de la gota. Los espermatozoides se dejaron con suficiente separación entre ellos para no interferir en su análisis posterior. Se retiró el portaobjetos y se dejó secar la gota de agua a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se dejaron caer gotas de solución de Carnoy recién preparada sobre la muestra durante 2 minutos. Seguidamente, se sumergió el portaobjetos en solución de Carnoy y se dejó 24h en la nevera. Finalmente, el portaobjetos se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.5. Tratamientos de ICSI

En los **Proyectos 2 y 3**, las parejas estudiadas realizaron ciclos de ICSI en los centros UEG y Ginefiv, respectivamente. Según el centro, hay pequeñas variaciones en el protocolo en relación a los medios de cultivo y de material fungible utilizado para estos tratamientos descritos en el artículo correspondiente a cada proyecto. De forma general, el proceso de ICSI se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación.

3.5.1. Estimulación ovárica y obtención de los ovocitos

Las mujeres recibieron hormonas FSH y LH para estimular la ovulación de un número elevado de ovocitos. Las dosis se calcularon según la reserva ovárica de la paciente, su índice de masa corporal y la respuesta a tratamientos anteriores. Se realizó la extracción de los ovocitos tras 34-36h. Los ovocitos se mantuvieron en medio de cultivo y se desnudaron con hialuronidasa. Las mujeres recibieron estrógenos para preparar el endometrio.

3.5.2. Preparación de la muestra de eyaculado

La muestra se obtuvo por masturbación tras 2-5 días de abstinencia sexual y se realizó un análisis de seminograma para valorar la posibilidad de realizar un tratamiento de ICSI.

Se preparó la muestra siguiendo un protocolo convencional (Swim-up o Gradientes de densidad) o un método microfluídico (ZyMöt™ICSI). Después se aspiraron de uno en uno con una micropipeta de inyección espermatozoides ICSI-S según su morfología y motilidad.

3.5.3. Fecundación y cultivo de embriones

Se microinyectó cada ovocito con un espermatozoide, se incubaron a 37°C en un incubador con CO₂ y O₂ y se evaluó la fecundación tras 18-20h. Se consideró fecundado todo aquel ovocito que presentaba dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

Se evaluó la morfología de los embriones y sus divisiones celulares para categorizarlos según la clasificación de la Asociación Española de Biología de la Reproducción (ASEBIR) en los grados A/B/C/D (128).

3.5.4. Test genético preimplantacional

En el **Proyecto 2** se realizó la detección de aneuploidías en los embriones mediante PGT-A. En primer lugar, se realizó una eclosión asistida en el día +3 p.c. para facilitar la biopsia en los días +5 o +6 p.c. Se utilizó un láser para crear un agujero en la zona pelúcida. Se aspiraron 4-6 células del trofotodermo que se cortaron con el láser. Las células biopsiadas se lavaron y se guardaron en un tubo estéril de 200µL. Tras la biopsia, se vitrificaron los embriones y se guardaron a -196°C hasta su uso. Las biopsias se analizaron en un laboratorio externo. Los aparatos y reactivos utilizados se describen en el manuscrito correspondiente al Proyecto 2.

3.5.5. Transferencia embrionaria y resultados clínicos

El embrión de mejor calidad se transfirió al útero de la madre coincidiendo con el pico de hormona LH. Se valoró la presencia de un embarazo bioquímico analizando la gonadotropina coriónica humana (βHCG; de sus siglas en inglés: *β-human chorionic gonadotropin*) en sangre.

Se determinó un embarazo clínico al detectar saco gestacional y latido fetal. Se diagnosticó un aborto cuando se interrumpió el latido fetal tras la determinación de un embarazo clínico.

3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS v20 (Statistic Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Los test aplicados se especifican en los artículos correspondientes a cada proyecto. De forma general, se estudió la Normalidad de las variables mediante el test Shapiro-Wilk cuando había menos de 30 muestras y el test Kolmogorov-Smirnov cuando había más de 30 muestras. Las variables Normales y No normales se estudiaron mediante test paramétricos y no-paramétricos, respectivamente.

Las diferencias entre las medianas de variables relacionadas se estudiaron mediante el Test de Wilcoxon. Las diferencias entre variables no relacionadas se estudiaron mediante el Test de Kruskal-Wallis. Para comparaciones dos a dos se utilizó el test U de Man-Whitney. En todos los casos, se aplicó un nivel de confianza del 95% (resultados estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Proyecto 1

4.1.1. Proyecto 1.1: Adaptaciones para el estudio de espermatozoides seleccionados

Durante la consecución del **Proyecto 1.1** se realizaron adaptaciones metodológicas para poder estudiar la fragmentación del ADN en espermatozoides microseleccionados (ICSI-S e ICSI-N). Se testaron diferentes protocolos atendiendo a los requerimientos de cada tipo de fijación.

4.1.1.1. Adaptaciones para fijaciones en agarosa

Para adaptar las técnicas que utilizan una fijación en matriz de agarosa (Comet neutro, Comet alcalino y SCD) se probaron diferentes condiciones descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Adaptaciones testadas para la fijación de espermatozoides microseleccionados en una matriz de agarosa.




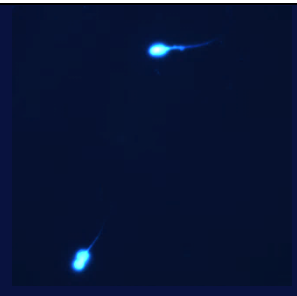
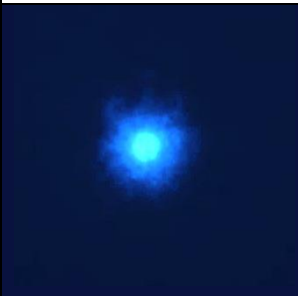
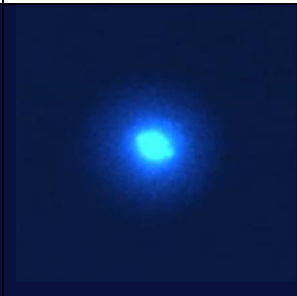
Condiciones	Valores testados
Volumen de la gota (μL)	1 / 3 / 5
Tiempo de homogeneización (seg)	0 / 1 / 2 / 5 / 10 / 20 / 30
Temperatura de gelificación	Temperatura ambiente / 4°C
Cubreobjetos	Sí / No

En cuanto al volumen de la gota de agarosa y el tiempo de homogeneización, se observó que en las combinaciones con menor volumen y elevado tiempo de homogeneización, los espermatozoides microinyectados se movieron desde su posición inicial en el centro de la gota hacia la periferia. En esta localización no se formaron correctamente halos de dispersión de la cromatina debido a la mayor dureza de la agarosa en el borde. En las combinaciones con mayor volumen y menor tiempo de homogeneización se formaron halos irregulares debido a la falta de mezcla entre la agarosa y el medio de inyección. Así pues, se determinó que el **volumen** ideal de la gota de microinyección era de $1\mu\text{L}$ con una **homogeneización** de 5 segundos para asegurar la correcta mezcla entre la agarosa y el medio manteniendo la posición de los espermatozoides en la zona central del gel (Tabla 2).

Al realizar la fijación de los espermatozoides en gotas de 1µL no fue necesario el uso de **cubreobjetos** para repartir el volumen de la gota. Al final del procedimiento de los test Comet y SCD se realiza una deshidratación de los geles que reduce su volumen permitiendo que los espermatozoides queden en el mismo plano de visualización en el microscopio.

La gelificación se probó a temperatura ambiente y a 4°C. Debido al poco volumen de gota requerido para las fijaciones (1µL de agarosa), la gelificación a 4°C resultó en un endurecimiento excesivo del gel que generó dispersiones anómalas de la cromatina. En cambio, la gelificación a **temperatura ambiente** resultó en dispersiones correctas (Tabla 4).

Tabla 4. Ejemplos de las adaptaciones testadas para la fijación de espermatozoides microseleccionados. Se muestran dos combinaciones descartadas y la combinación de condiciones que ha resultado óptima.

Condiciones	Combinaciones descartadas		Combinación óptima
Volumen de la gota	1 µL	5 µL	1 µL
Tiempo de homogeneización	30 seg	1 seg	5 seg
Temperatura de gelificación	Ambiente	4°C	Ambiente
Resultado	Buena homogeneización pero los espermatozoides se mueven hacia los bordes sin dispersión de la cromatina	Mala homogeneización del medio en la agarosa que genera una mala dispersión de la cromatina	Buena homogeneización, localización de los espermatozoides y dispersión de la cromatina
Esquema del resultado			
Imagen del resultado			

4.1.1.2. Adaptaciones para fijaciones en Carnoy

Se probaron diferentes condiciones de tipo de medio de fijación, volumen de la gota y tiempo de fijación en Carnoy (Tabla 5).

Tabla 5. Adaptaciones testadas para la fijación de espermatozoides microseleccionados con solución de Carnoy.

Condiciones	Valores testados
Medio de microinyección	Agua miliQ / HAM F10
Volumen de la gota (μL)	1 / 3 / 5
Tiempo de tratamiento inicial con Carnoy (min)	1 / 2 / 5

El uso del medio HAM F10 para la microinyección de los espermatozoides (ICSI-S o ICSI-N) y su posterior fijación en solución de Carnoy resultó en fijaciones con residuos secos del medio. Por el contrario, el uso de **agua miliQ** para la gota donde se microinyectan los espermatozoides y el tratamiento posterior con solución de Carnoy resultó en fijaciones limpias.

En cuanto al **volumen** de la gota, un mayor volumen conllevó una dispersión mayor de los espermatozoides tras su microinyección. En cambio, el uso de gotas de $1\mu\text{L}$ permitió mantener fijos los espermatozoides en la localización de microinyección.

Tras microinyectar los espermatozoides se dejó secar la gota de agua miliQ durante 10 minutos. Se determinó que la fijación óptima requería un tratamiento lento inicial dejando caer sobre la muestra solución de Carnoy recién preparada gota a gota durante 2 minutos. Posteriormente, se sumerge el portaobjetos en solución de Carnoy overnight. **Tiempos** menores resultaron en una mala fijación y en la pérdida de espermatozoides.

4.1.1.3. Eficiencias de las adaptaciones

Una vez establecidas las adaptaciones óptimas para poder estudiar espermatozoides microseleccionados, se testaron un total de 3.217 ICSI-S como parte del Proyecto 1.2. Para conocer la utilidad de esta metodología se evaluó: i) la **eficiencia de recuperación** (número de espermatozoides visualizados tras la fijación respecto del número de espermatozoides

microinyectados en las gotas de agarosa o agua miliQ) y ii) la **eficiencia de análisis** (número de espermatozoides analizables respecto el número de espermatozoides visualizados). Los resultados de las eficiencias de estas adaptaciones se muestran la Tabla 1 dentro del artículo publicado correspondiente al Proyecto 1.2.

En cuanto a la eficiencia de recuperación, se observó que un 3% de los espermatozoides aspirados no se encuentran tras la inyección. Sobre la eficiencia de análisis, un 15% de los espermatozoides observados en las fijaciones de agarosa mostraron artefactos en la dispersión de la cromatina que impidió su evaluación. Todos los espermatozoides fijados con solución de Carnoy pudieron ser analizados.

4.1.2. Proyecto 1.2: Estudio de la fragmentación del ADN espermático en muestras de eyaculado, Swim-up e ICSI-S

Los resultados finales correspondientes al **Proyecto 1.2** se han recogido en un artículo publicado en 2021.

- **Título:** *Sperm selection during ICSI treatments reduces single- but not double-strand DNA break values compared to the semen sample.*
- **Autores:** Sandra Lara-Cerrillo; Jordi Ribas-Maynou; Candela Rosado-Iglesias; Tania Lacruz-Ruiz; Jordi Benet y Agustín García-Peiró.
- **Fecha de aceptación:** 23 de febrero de 2021.
- **Referencia y enlace:** <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02129-w>
- **Revista:** *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.*
- **Factor de impacto (2021):** 3,412.

Además, los resultados de este estudio se han presentado en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

- XV jornada sobre la Biología de la Reproducción de la *Societat Catalana de Biologia* (SCB). 2017. Exposición oral.
- 32º congreso nacional bianual de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF). 2018. Exposición oral.

El artículo publicado se muestra a continuación.



Sperm selection during ICSI treatments reduces single- but not double-strand DNA break values compared to the semen sample

Sandra Lara-Cerrillo¹ · Jordi Ribas-Maynou² · Candela Rosado-Iglesias¹ · Tania Lacruz-Ruiz¹ · Jordi Benet² · Agustín García-Peiró¹

Received: 22 December 2020 / Accepted: 23 February 2021 / Published online: 4 March 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

Purpose To detect a possible bias in sperm DNA fragmentation (SDF) testing when performed on semen samples or on those few spermatozoa selected for Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) treatments.

Methods A multimethodological analysis of Single- and Double-Strand DNA Breaks (SSB and DSB, respectively) was performed through the Neutral Comet, the Alkaline Comet, the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) and the Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling (TUNEL) assays. SDF was evaluated in (i) semen samples from 23 infertile patients (not achieving pregnancy or suffering recurrent miscarriage); (ii) samples after a Swim-up and (iii) spermatozoa microselected for ICSI (ICSI-S).

Results The analysis of 3217 ICSI-S revealed a significant reduction of SSB values compared to the Ejaculate and the Swim-up samples. On the contrary, DSB values were not reduced after any sperm selection method. The No-pregnancy group presented poorer semen parameters and higher SSB values. The Recurrent miscarriage group presented better semen parameters but also higher DSB values.

Conclusion The analysis of SDF on semen samples may not be fully representative of those few spermatozoa selected for ICSI. Since oxidative stress impairs sperm motility and causes SSB, selecting a motile sperm may intrinsically imply choosing a sperm not affected by this damage. DSB have an enzymatic origin which does not affect motility, making it difficult to select a sperm without this damage. Therefore, ICSI treatments could be effective in patients presenting high SSB values. Patients presenting high DSB values should expect bad ICSI results if this damage is not reduced through other specific methods.

Keywords ICSI · Sperm selection · Sperm DNA fragmentation · Double-strand breaks · Comet assay

✉ Agustín García-Peiró
info@cimab.es

Sandra Lara-Cerrillo
sandralarace@gmail.com

Jordi Ribas-Maynou
j.ribas87@gmail.com

Candela Rosado-Iglesias
candela.rosado@gmail.com

Tania Lacruz-Ruiz
tania.lr2310@gmail.com

Jordi Benet
jordi.benet@uab.cat

Introduction

The spermatozoon is a highly differentiated cell designed to propel itself through the female genital tract and deliver the paternal genome to the oocyte. However, defects in the normal development of spermatozoa may interfere with this process leading to fertility impairments [1]. It is estimated that the cause may be attributed to the male in 50% of couples with primary infertility. In this sense, male infertility is present in 6–7% of couples of reproductive age and affects approximately 30 million men worldwide [2].

The study of the male factor should include the evaluation of the global fertility potential of spermatozoa [3]. However, this comprehensive evaluation may be challenging since males may present a wide variety of alterations in semen such as impaired chromatin organisation [1, 4]; numerical or structural chromosomal alterations [5, 6]; Y chromosome

¹ CIMAB, Barcelona Male Infertility Centre, C/Vallcorba 1A-3A, Sant Quirze del Vallès, 08192 Barcelona, Spain

² Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), M Building, Av/ de Can Domènech, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

microdeletions [7]; DNA fragmentation [8]; altered ratio of protamines P1/P2 [9]; epigenetic alterations [10] or the presence of antisperm antibodies in the seminal plasma [11]. The difficulty of performing a comprehensive study leads 30–40% of cases to remain idiopathic [12]. However, the absence of a conclusive diagnosis may occur as a result of only focusing on a standard semen evaluation, which real impact on fertility has been widely discussed [13, 14]. In this regard, some studies found that, at least, 15% of infertile patients present with normal semen parameters [15] and that morphologically normal sperm may be aneuploid [16] or may have DNA fragmentation [17]. Obtaining a diagnosis is even more relevant in couples undergoing Assisted Reproductive Technologies (ART), especially in Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) treatments. During ICSI cycles, embryologists select a single spermatozoon with normal morphology and motility to be injected to the oocyte. However, these spermatozoa may have a defective genome that could impair embryo development and implantation [6].

The study of Sperm DNA Fragmentation (SDF) has been an emerging field for the diagnosis of male infertility [18]. Different SDF tests are currently available, including the Comet assay; the Sperm Chromatin Dispersion test (SCD); the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and the Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling test (TUNEL) [19–21]. From these methods, the Comet assay can differentiate between Single-Strand Breaks (SSB) and Double-Strand Breaks (DSB) under alkaline and neutral pH conditions, respectively [21, 22]. The impact of SDF on reproductive outcomes in natural conceptions and ART cycles has been widely studied [21]. Some authors reported that high values of SDF are associated with lower pregnancy rates in natural conceptions [23]; intrauterine inseminations [24, 25] and conventional *in vitro* fertilisation treatments [26–28]. However, the relationship between SDF and ICSI outcomes still remains controversial, with some studies showing a correlation between high SDF values and low pregnancy rates [26–29], while other studies do not find such correlation [30, 31]. This discrepancy may be attributed to several confounding factors such as the use of different analysis tests; the use of different cutoff values or the lack of distinction between SSB and DSB [29]. All these confounding factors led to the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) to conclude that there is not a consistent relationship between SDF and ART clinical outcomes [32]. As other authors suggested before [21, 33], in the present study, we propose sperm selection in ICSI, based on sperm morphology and motility, to be an additional factor contributing to these discrepancies.

The main objective of this study was to determine whether SDF values in semen samples are representative of those few spermatozoa selected during ICSI treatments. A multimethodological analysis of SDF was performed using the Neutral Comet, the Alkaline Comet, the SCD and the

TUNEL tests. The impact of SDF and ICSI sperm selection on reproductive outcomes was also evaluated in male patients from couples who never achieved pregnancy and couples suffering recurrent miscarriage.

Materials and methods

Sample collection and inclusion criteria

Semen samples from 23 infertile patients (30–46 years of age) seeking infertility screening at the CIMAB Male Fertility Centre in Barcelona (Spain) were included in the study. All couples reported more than 1 year of idiopathic infertility, including no detected female factor (ovarian reserve, tubal factor, endometriosis, hormonal disturbances or karyotype alterations) or male factor (varicocele, hormonal disturbances, genitourinary infection or karyotype alterations). Patients with severe alterations in semen parameters (≤ 0.5 mL of volume; $\leq 5 \times 10^6$ sperm/mL or $\leq 10\%$ of motile sperm) were excluded from the study. For the second part of the study, couples were divided in two groups attending on their fertility background: (i) couples who never achieved a natural pregnancy or presenting two or more implantation failures in ICSI cycles (No-pregnancy group) and (ii) couples presenting two or more consecutive pregnancy losses (Recurrent miscarriage group). The study was approved by the Corporació Sanitària Parc Taulí Ethics Committee (Ref.: 2014676) and signed informed consents were obtained from all patients.

Sample preparation and sperm selection

Samples were obtained by masturbation after 3–4 days of sexual abstinence and semen parameters were assessed using the SCA CASA software (Microptic S.L., Spain) [34]. Samples were divided in two aliquots and centrifuged at 300g for 3 min. The supernatants were discarded and one of the pellets was resuspended in PBS medium (Ejaculate sample). The other pellet was used for a Swim-up procedure by slowly overlaying 500 μ L of HAM's medium (Nutrient Mixture F-10 HAM, Sigma-Aldrich, USA) with at an angle of 45° and incubated at 37°C for 30 min. Finally, 50 μ L of the upper fraction was collected (Swim-up sample) [adapted from 33 and 34].

For sperm microselection, 1 μ L of the Swim-up sample was placed in a 5- μ L drop of 10% polyvinylpyrrolidone (PVP; Origio, Denmark). Spermatozoa with normal morphology and progressive motility (ICSI-S sample) were selected and placed in a neat 1- μ L PVP drop using ICSI pipettes (Vitrolife, Sweden) under $\times 200$ magnification connected to a micromanipulation system (Nikon Diaphot microscope and Narishige micromanipulator, Nikon Inc., Japan) [35].

Sperm DNA fragmentation analysis

SDF was analysed using four different tests on Ejaculate samples and after the Swim-up procedure following conventional protocols.

The Alkaline and Neutral Comet assays were carried out under specifically designed conditions to allow for the differentiation of SSB and DSB, respectively [36]. Semen samples were washed in PBS and mixed with 1% low-melting-point agarose (1:2 v/v) (Sigma-Aldrich, USA); 5 μ L was placed on a slide and covered with a coverslip. Samples jellified at 4°C and slides were immersed in two consecutive lysis solutions. The Alkaline Comet electrophoresis was performed at 20V for 4 min in 0.03M NaOH buffer (pH 12.2) after a denaturing treatment in a 0.03M NaOH, 0.15M NaCl solution (pH 12). The Neutral Comet electrophoresis was performed at 20V for 12.5 min in TBE buffer (pH 8.5). Finally, both slides were washed in a 0.4M Trizma Base neutralisation solution (pH 7.5), dehydrated in ethanol series and horizontally dried. Samples were stained with DAPI (Diamond Antifade Mountant with DAPI, Invitrogen, USA) and 400 spermatozoa were classified attending on the morphology and the tail-length of the comet according to the criteria reported before [22]. Spermatozoa with non-fragmented DNA (normal) showed a major percentage of DNA in the comet core and a short tail, while spermatozoa with SSB or DSB showed a lower percentage of DNA in the comet core and larger tails [22].

The SCD assay was performed according to the protocol previously described by Fernández et al. [37]. Semen samples were washed in PBS and mixed with agarose (1:2 v/v); 5 μ L was placed on a slide and covered with a coverslip. Samples jellified at 4°C for 5 min. Slides were immersed in a 0.1N HCl denaturing solution for 7 min, in lysis solution for 25 min and finally into a neutralisation solution for 5 min. Samples were dehydrated in ethanol series and horizontally dried. Samples were stained with DAPI and 200 spermatozoa were classified as normal or fragmented according to the size of the observed halo following the criteria reported in Fernández et al. [37]. Spermatozoa with non-fragmented DNA (normal) showed big and medium haloes, while fragmented spermatozoa showed small or no halo.

Semen samples for the TUNEL assay were washed twice in fresh Carnoy solution (acetic acid:methanol, 1:3 v/v). After 24 h in Carnoy solution, samples were washed again in fresh Carnoy solution and 5 μ L was fixed on a slide. The assay was performed using the *In Situ Cell Death Detection Fluorescein* kit (Roche, Germany). The Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) enzyme was mixed with the labelling solution (1:9 v/v) and 5 μ L was placed on each sample. Slides were incubated at 37°C for 1 h. Three washing steps were performed in PBS for 10 min each. A positive control (sample incubated at 37°C for 30 min with 2000U/ μ L of

deoxyribonuclease I from bovine pancreas (Sigma-Aldrich, Germany)) and a negative control (not adding the TdT enzyme) were included on each slide. Samples were stained with DAPI and 200 spermatozoa classified as normal or fragmented according to the manufacturer's instructions. Spermatozoa with fragmented DNA showed green fluorescence (Nikon Eclipse E200 and Nikon Intensilight C-HGFI, Nikon Inc., Japan).

Sperm DNA fragmentation analysis on ICSI-selected spermatozoa

The former tests were methodologically adapted to analyse DNA damage on individual ICSI-S following two different protocols. Firstly, for the Comet and the SCD assays, 10–20 spermatozoa were aspirated from the neat PVP drop, rapidly placed inside a 1- μ L low-melting-point agarose drop on a slide and jellified for 5 min at room temperature. Secondly, for the TUNEL assay, groups of 10–20 spermatozoa were rapidly placed on a 1- μ L ultrapure water drop. Samples were allowed drying for 5 min at room temperature. Slides were immersed in Carnoy solution for 24 h and allowed drying vertically. After DNA fixations, conventional versions of each assay were performed. On agarose fixations, 5-min ethanol series were necessary at the end of the procedure to allow a complete dehydration of samples.

Statistical analysis

SDF was compared between Ejaculate, Swim-up and ICSI-S samples. Moreover, SDF and semen parameters were compared between patients' groups (No-pregnancy or Recurrent miscarriage).

All parameters were assessed for normality through the Shapiro-Wilk test. As parameters did not show a normal distribution, non-parametric tests were applied. The Wilcoxon test was used for statistical comparisons between samples. All tests were considered significant with a confidence interval of 95%.

Results

Modified sperm DNA fragmentation methodologies

A total of 3217 spermatozoa from 23 infertile patients were individually selected according to the ICSI criteria for sperm morphology and motility. From these, 3117 ICSI-S could be finally visualised on the slides (mean recovery efficiency: 97.0%). About 3% of the spermatozoa were lost during their aspiration and placement on the slides. From the visualised ICSI-S, a total of 2649 could be analysed (mean analysis efficiency: 84.5%) (Table 1). In agarose fixations, about 15% of

Table 1 Adaptation of four Sperm DNA Fragmentation (SDF) testing methods to evaluate ICSI-selected spermatozoa (ICSI-S): recovery and analysis efficiencies and number of visualised and analysed cells

SDF assay	Recovery efficiency (%)	Analysis efficiency (%)	Visualised ICSI-S	Analysed ICSI-S
Neutral Comet	98.28	78.45	761	597
Alkaline Comet	95.06	77.87	741	577
SCD	98.20	81.58	760	620
TUNEL	96.27	100.00	855	855

visualised sperm could not be analysed. In contrast, all ICSI-S fixed in Carnoy solution could be analysed. For each technique, a mean of 662.25 spermatozoa could be analysed (Fig. 1; Table 1).

Sperm DNA fragmentation assessment

Comparisons between samples: Ejaculate, Swim-up and ICSI-selected spermatozoa

The results obtained using four different methods for the measurement of SDF on the Ejaculate, the Swim-up and the ICSI-S samples are shown in Figs. 1 and 2a. SDF analysis showed a significant reduction of SSB values in Swim-up samples compared to the Ejaculate using the Alkaline Comet, the SCD and the TUNEL tests (reduction of 8.39%, 8.10% and 5.83%, respectively; p values < 0.05). This reduction in SSB values was even more important in ICSI-S compared to the Ejaculate (reduction of 31.35%, 17.85% and 16.00%, respectively; p -values < 0.05) and the Swim-up samples (reduction of 22.96%, 9.75% and 10.77%, respectively; p values < 0.05) (Fig. 2a). In contrast, the Neutral Comet assay did not show any differences in DSB values between the Ejaculate, the Swim-up and the ICSI-S (p values > 0.05) (Fig. 2a).

Comparisons between clinical groups: No-pregnancy and Recurrent miscarriage

Comparison of SDF values between clinical groups indicated statistically significant differences when using the Comet assays but not the SCD or TUNEL tests (Fig. 2b). The No-pregnancy group showed a significant increase of 16.03% in SSB values compared to the Recurrent miscarriage group as measured through the Alkaline Comet (p value = 0.030). The SCD and the TUNEL tests did not show significant differences (2.54% and 1.48%, respectively; p values > 0.05). In contrast, the Recurrent miscarriage group showed a significant increase of 7.73% in DSB values, as measured by the Neutral Comet assay (p value = 0.026) (Fig. 2b).

Semen parameters

Patients from the No-pregnancy group showed poorer semen parameters compared to those patients from the Recurrent

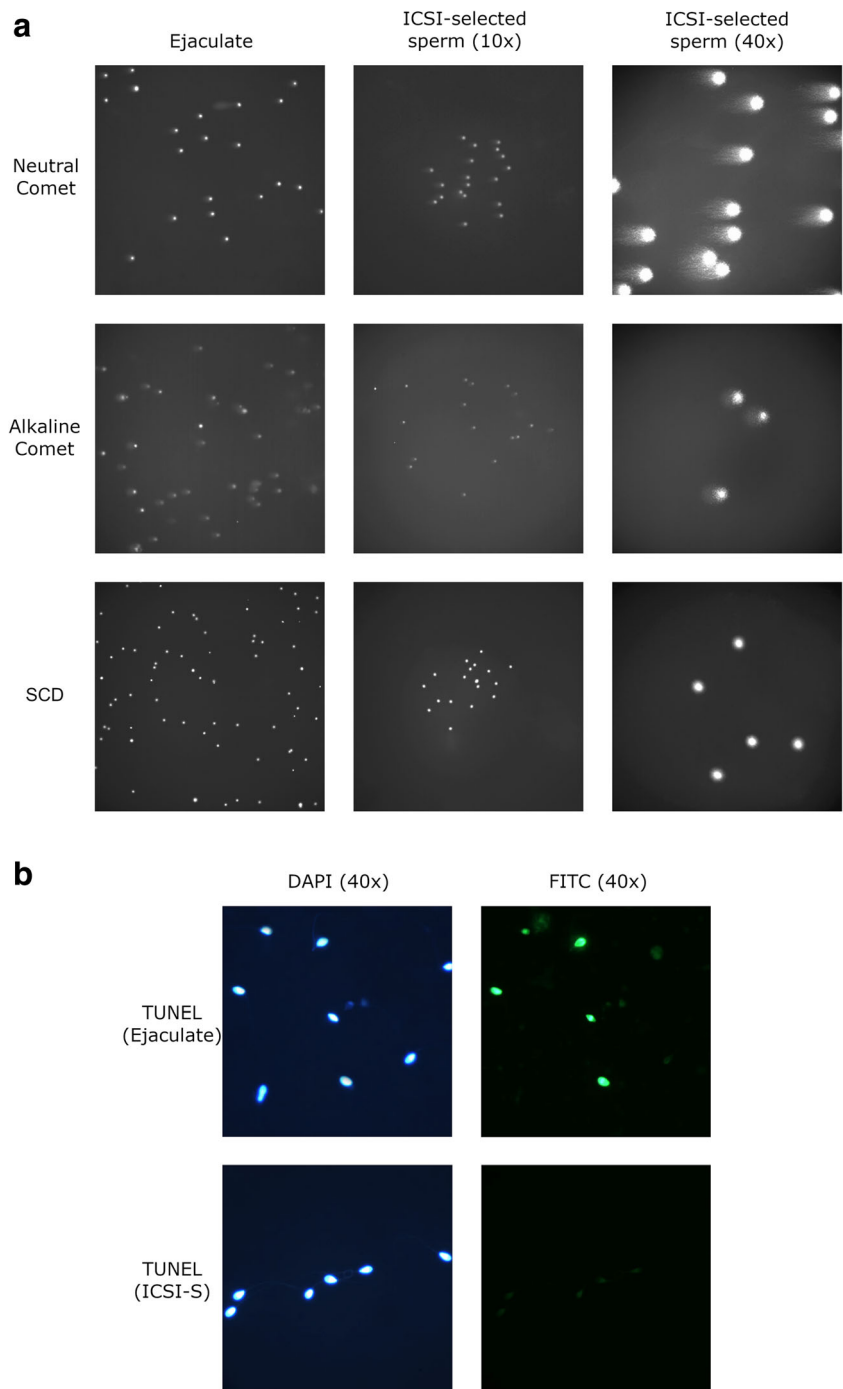
miscarriage group. Significant differences were found in sperm concentration, the percentage of sperm with progressive motility and the percentage of immobile sperm (Table 2).

Discussion

Three main findings emerge from this study: firstly, sperm selection using the ICSI criteria of normal morphology and motility results in a reduction of SSB compared to the observed values in Ejaculated and Swim-up samples, as measured by the Alkaline Comet assay, the SCD and the TUNEL tests. On the contrary, ICSI selection does not reduce DSB values, as measured by the Neutral Comet assay. This discrepancy in DNA damage values in semen samples compared to ICSI-S may explain, at least in part, the reported lack of correlation between SDF and reproductive outcomes in ICSI. Secondly, compared to the SCD and TUNEL tests, the Comet assay has a greater sensitivity in detecting SSB and DSB. And thirdly, the Neutral Comet assay is the only SDF test that detects DSB in the studied patients.

In this study, 3217 single spermatozoa were selected under $\times 200$ magnification (Fig. 1). To our knowledge, this is the first time that four different techniques used for SDF testing have been successfully adapted and applied to differentiate SSB and DSB in ICSI-S (Table 1). The sperm recovery efficiency was of 97.0% and the analysis efficiency was of 84.5%. However, some sperm loss occurred between the aspiration of ICSI-S from the neat drop and their fixation in agarose or ultrapure water. During ICSI treatments, one single sperm should be aspirated and kept inside the micropipette between the tip and the elbow until the injection. Due to procedural requirements, groups of 10–20 spermatozoa were aspirated together surpassing the micropipette elbow in some cases. Since after this point the inner diameter of the micropipette is higher, spermatozoa could have been lost in that space. The aspiration of a lower volume of media during aspiration and the selection of a lower number of spermatozoa were considered but did not significantly improve sperm recovery while the experimental time was increased. In this sense, the optimal conditions for ICSI-S fixation were established as described in the “Materials and methods” section. The analysis efficiencies showed that all spermatozoa fixed in ultrapure water and Carnoy solution could finally be analysed using the TUNEL

Fig. 1 Microscopic images of ejaculated and ICSI-selected spermatozoa analysed by Neutral Comet, Alkaline Comet, SCD (a); and TUNEL assays (b)



assay. On the other hand, some ICSI-S fixed in agarose could not be analysed due to the incomplete chromatin dispersion and the irregular electrical current that happens in the edge of the agarose drops. This situation is well known as the “edge effect” in agarose electrophoresis. Moreover, some sperm moved from their initial location impairing the correct analysis of other spermatozoa. Keeping ICSI-S further apart during fixations in agarose may reduce analytical interferences.

About SDF, previous studies showed a strong correlation between the Alkaline Comet assay under specific conditions

(which mainly detects SSB) and the SCD and the TUNEL assays [38, 39]. The results here obtained using these tests revealed that SSB values are lower in the Swim-up sample compared to the Ejaculate (Fig. 2a). This is in agreement with previous reports using only the SCD test [40, 41]. This reduction in SSB values is even more prominent in ICSI-S compared to the Ejaculate (Fig. 2a) and could be explained based on whether this type of DNA damage is measured on non-motile or motile sperm: SSB values are higher in the Ejaculate sample (which include motile and non-motile sperm)

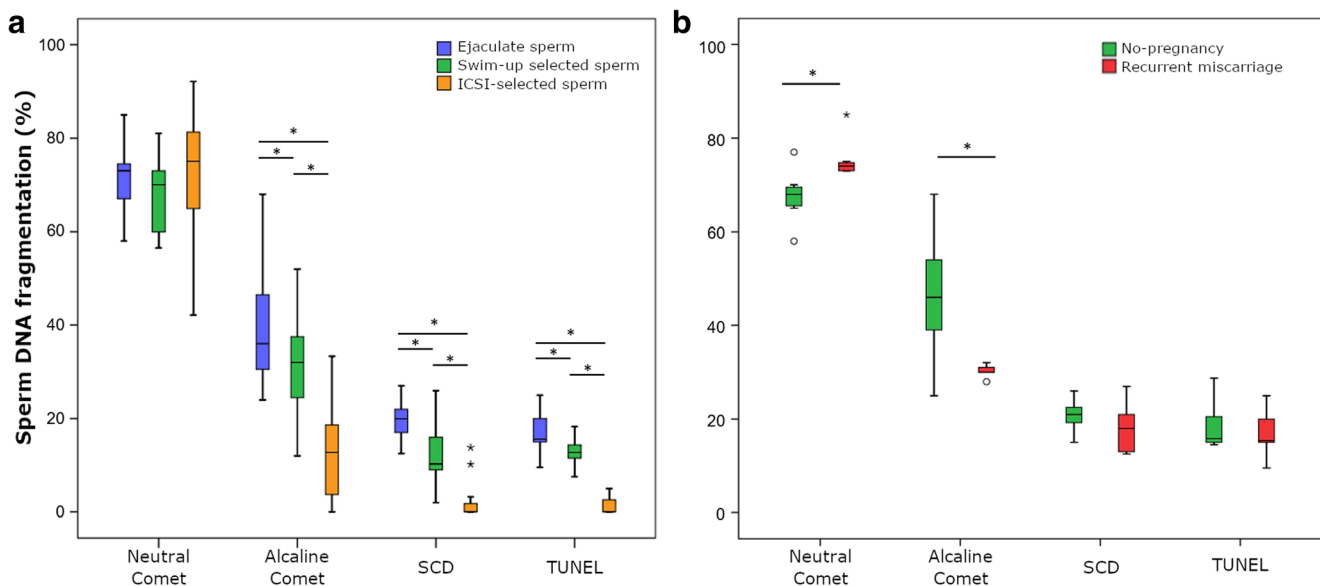


Fig. 2 Multimethodological analysis of sperm DNA fragmentation on (a) Ejaculated, Swim-up-selected and ICSI-selected spermatozoa (ICSI-S) and (b) Ejaculate samples according to patients' fertility background (No-pregnancy and Recurrent miscarriage). Outlier values 3 and 1.5

times out of the Q3 interquartile range are indicated with asterisks and circles in the boxplot, respectively. Horizontal bars with an asterisk symbol indicate significant differences (p value < 0.05)

compared to the Swim-up sample (mainly motile sperm) and ICSI-S (only sperm with optimal progressive motility).

Oxidative stress could be responsible of this great reduction in SSB values after sperm selection. Reactive oxygen species (ROS) induce DNA and membrane damage, which are the main cause of both SSB (through the formation of 8-hydroxy-29-deoxyguanosine (8OHdG)) and motility loss (through the alteration of the normal function of mitochondria to produce ATP and/or through alterations at the cell membrane) [42]. It is worth noting that, in some previous reports evaluating DNA damage and motility, SSB and DSB were not differentiated [42, 43]. However, authors tested DNA damage through techniques that correlate with the Alkaline Comet and mainly detect SSB [38, 39]. Concerning the effect of oxidative stress, varicocele is one of the main causes of male infertility

and has shown to increase intratesticular ROS levels, while its surgical repair has shown to reduce these values [44, 45]. In a recent study, the effect of ROS-induced DNA and membrane damage was tested in patients with high-grade varicocele, consistently showing a significant reduction in SSB and an improvement in sperm motility after its surgical repair [46].

Related to the latter findings, patients who never achieved pregnancy or showed implantation failures in previous ICSI cycles (No-pregnancy group) presented both lower sperm motility and higher SSB levels compared to patients who achieved clinical pregnancies but who suffered recurrent miscarriage (Recurrent miscarriage group) (Table 2; Fig. 2b). This is in agreement with previous reports that showed a negative correlation between high SSB values and implantation failures [25, 47, 48], and also with those studies which reported an

Table 2 Number of patients, age, semen parameters and comparisons between groups

	Patients			Differences between groups p values
	All patients	No-pregnancy	Recurrent miscarriage	
N	23	13	10	
Age	37.70 ± 4.75	37.54 ± 5.08	37.90 ± 4.56	1.000
Volume (mL)	3.16 ± 1.56	2.96 ± 1.76	3.70 ± 1.58	0.135
Concentration (10^6 /mL)	79.38 ± 90.80	47.36 ± 17.81	114.26 ± 55.68	0.022*
Motility pattern:				
Progressive (%)	41.24 ± 19.06	33.32 ± 10.50	51.92 ± 9.49	0.010*
Non-progressive (%)	20.33 ± 6.75	18.28 ± 4.54	23.79 ± 6.52	0.125
Immobile (%)	36.22 ± 18.51	43.20 ± 12.07	23.10 ± 11.79	0.010*
Hyperactive (%)	2.62 ± 2.31	2.51 ± 2.35	2.88 ± 2.49	0.711

*Significant differences with a confidence interval of 95%

improvement in pregnancy rates after ICSI selection of a motile sperm in patients with high SSB [21, 49]. SSB has been reported to be present in an extensive manner in sperm's DNA [36]. Even if a sperm with poor motility fertilises an oocyte through natural or assisted reproduction, the repair capacity of the oocyte may not overcome this extensive damage impairing the first mitotic divisions of the embryo and finally leading to a failed pregnancy [36]. Based on these results, in male patients who do not achieve pregnancy or presenting high rates of SSB, an ICSI treatment through a Swim-up procedure to prepare the semen sample followed by sperm microselection under strict criteria of motility could be recommended since these procedures would importantly reduce SSB damage.

In sharp contrast, a correlation between DSB and oxidative stress or decreased sperm motility has never been found [50]. This type of DNA damage is mainly produced during the prophase I stage of meiosis through the action of SPO11 to allow the recombination process between homologous chromosomes and to allow the hypercondensation of chromosomes during the protamination process in the Matrix Attachment Regions (MAR regions) [51–53]. These programmed breaks are expected to be repaired after recombination through the mediation of ATM-dependent repair systems. However, when the repair systems are inefficient or when DNA breaks are generated in excess, high rates of DSB may be present in ejaculated spermatozoa [54]. The results of the present study show that DSB values are similar in the Ejaculate sample, the Swim-up sample and ICSI-S, even if these cells present high progressive motility and good morphology (Fig. 2a).

These results provide strong support to a previous study in which human embryo kinetics was monitored by time-lapse microscopy. In that study, oocytes were microinjected with spermatozoa from patients with high SSB or DSB values detected in semen samples [55]. The results showed that the microinjection of motile spermatozoa from samples with high SSB values did not affect embryo kinetics and implantation rates [56], while microinjecting spermatozoa from samples with high DSB values resulted in a delay in embryo kinetics along all stages of embryo development [55]. To explain these results, one must remember that DSB have an enzymatic and controlled origin, so this damage is not produced in an extensive manner such as SSB. Consequently, the oocyte may be able to repair these breaks at some extent. If sperm's DSB exceed the repair capacity of the oocyte or if non-consecutive ends are ligated by error, the embryo could carry chromosomal abnormalities that may impair embryo development or end up in a miscarriage [36, 57]. Consistently, the present results show that the risk of recurrent pregnancy loss is increased when patients present high DSB values (Fig. 2b) [36] even if these patients present normal semen parameters (Table 2) [58]. Based on these results, in patients with recurrent miscarriage or showing high DSB values, semen processing through a Swim-up or ICSI sperm selection may not have any effect in

reducing this damage. Therefore, alternative methods for sperm selection should be considered to specifically reduce DSB values.

During ART procedures, different techniques are available for semen preparation with the objective of selecting optimal spermatozoa. Conventional methods such as Swim-up or Density Gradients procedures are based on sperm's motility; therefore, these approaches are only expected to reduce SSB (Fig. 2a) [59]. New microfluidic sorting devices have recently emerged for the selection of sperm with optimal progressive motility. In agreement with the results here presented, these methods showed to strongly reduce SSB, nearly to undetectable values through the SCD and the TUNEL tests [60–62]. Moreover, these filters based on microfluidics pretend to mimic the natural sperm selection produced through the female genital track [63, 64]. Recent studies showed that these devices increase clinical outcomes in ICSI treatments (more high-quality euploid embryos and higher implantation and pregnancy rates) [62, 65]. We hypothesise that these great results could be related to the reduction of both SSB and DSB since the detrimental effects of DSB on embryo kinetics are not observed after the use of these new devices [55]. Further investigations studding the capacity of these microfluidic sorting devices to specifically reduce DSB values and its effect on ICSI clinical outcomes may be enlightening.

Since ICSI is the most commonly used ART technique worldwide [66], in this study, we focused on the utility of the ICSI criteria in selecting sperm with low levels of SDF. Interestingly, previous studies analysed SDF values in single spermatozoa based on morphology criteria analysed under high magnification (Motile Sperm Organelle Morphology Examination, MSOME) [67–70]. Despite their differences, all these studies revealed that spermatozoa with abnormal morphology (e.g. nuclear vacuoles) present higher SDF rates while sperm with normal morphology present lower values. Concerning the utility of sperm selection under high magnification in ICSI cycles (Intracytoplasmic Morphological Sperm Injection, IMSI), some studies found that this procedure improves reproductive outcomes compared to conventional ICSI treatments [71, 72]. However, other studies, such as a recent meta-analysis of the Cochrane database, found opposite conclusions [73–76]. From these studies, only Pastuszek et al. analysed SSB and DSB separately, although using a different version of the Comet assay [69]. Results showed that 70–80% of sperm presenting normal morphology without vacuoles have low SDF values. However, about 20–30% of these morphologically normal sperm present SSB and DSB. In this sense, the IMSI procedure could increase the chances of selecting a sperm not affected by SDF, thus increasing ART results in this subpopulation of patients with SDF detected in semen samples. More studies analysing a large number of ICSI and IMSI cycles after detecting SSB and DSB would be necessary to confirm this hypothesis.

The findings from this study may also help to explain, at least in part, the controversy in the apparent lack of correlation between SDF values and ICSI reproductive outcomes [31]. The published guidelines from the ASRM claimed that most studies comparing SDF values with reproductive outcomes included confounding factors [32]. The analysis of all these studies led the authors to conclude that there is not enough evidence to support SDF testing to predict reproductive outcomes in natural or ART cycles. One of the main findings emerging from the present study is that, in order to find a correlation between SDF and reproductive outcomes, SSB and DSB must be differentiated. Since most tests do not differentiate between SSB and DSB damage and since SSB values in ejaculated spermatozoa do not correlate with those values obtained in ICSI-S, a lack of correlation between high SDF values in ejaculated spermatozoa and poor reproductive outcome might be misleading.

In view of these results, new possible biomarkers for the diagnosis of the male factor or predictors of ART success such as the analysis of the following: mitochondrial DNA [77]; free sperm DNA in semen [78]; surface charge; membrane integrity or membrane proteins [1], among others, should demonstrate that their analysis on the Ejaculate sample is representative of those few spermatozoa finally injected into the oocytes. If present in ICSI-S, these new biomarkers could open new investigations on possible diagnostics and treatments for male infertile patients.

In conclusion, the results of this study show that sperm selection using the ICSI criteria selects spermatozoa with lower SSB values compared to the Ejaculate and the Swim-up samples, as measured by the Alkaline Comet, the SCD and the TUNEL assays. On the contrary, these selection methods may not have any effect in selecting sperm with lower DSB values, as measured by the Neutral Comet assay. Compared to the SCD and TUNEL tests, the Comet assay has a greater sensitivity in detecting SDF in the studied patients. In terms of reproductive outcomes, the ICSI procedure in itself could be considered an effective technique for sperm selection in patients with high SSB values or in patients who never achieved pregnancy. In contrast, ICSI may not be effective in reducing DSB in spermatozoa from patients with recurrent miscarriage or in patients with high DSB values. Therefore, a specific sperm selection technique should be recommended to select sperm with lower DSB for ICSI.

Acknowledgements We thank Dr. Denny Sakkas for his useful comments on the final manuscript.

Authors' contribution SLC performed the experiments and participated in the study design, the data analysis and the manuscript writing and review. JRM participated in the study design and data analysis. TLR and CRI performed the experiments. JB contributed to the manuscript

review. AGP contributed to the study design, analysis of data and manuscript review and final approval.

Funding SLC received an Industrial Doctorate grant (Doctorados Industriales) given by the Economy, Industry and Competitiveness Ministry of Spain (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad) and the State Investigation Agency (Agencia Estatal de Investigación) (Ref.: DI-16-08429).

Code availability Not applicable.

Declarations

Ethics approval The study was approved by the Corporació Sanitaria Parc Tauli Ethics Committee (Ref.: 2014676) and signed informed consents were obtained from all patients.

Consent to participate Patients consented to participate.

Consent for publication Patients consented to participate.

Conflict of interest AGP is the director of the CIMAB centre, a university spin-out company with a commercial interest in SDF testing. No other author has a conflict of interest to declare.

References

- Vaughan DA, Sakkas D. Sperm selection methods in the 21st century. *Biol Reprod.* 2019;101:1076–82.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:1–9.
- Jeyendran RS, Caroppo E, Rouen A, Anderson A, Puschek E. Selecting the most competent sperm for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril.* 2019;111:851–63.
- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2003;9:331–45.
- Ioannou D, Griffin DK. Male fertility, chromosome abnormalities, and nuclear organization. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133:269–79.
- Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Genetics and male infertility. *Androl Clin.* 2006;462–80.
- Dhanoa JK, Mukhopadhyay CS, Arora JS. Y-chromosomal genes affecting male fertility: a review. *Vet World.* 2016;9:783–91.
- Simon L, Emery BR, Carrell DT. Sperm DNA fragmentation consequences for reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2006;12:417–35.
- Gunes S, Arslan MA, Hekim GNT, Ascı R. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33:553–69.
- Samplaski MK, Agarwal A, Sharma R, Sabanegh E. New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. *Int J Urol.* 2010;17:839–47.
- Katz DJ, Teloken P, Shoshany O. Male infertility - the other side of the equation. *Aust Fam Physician.* 2017;46:641–6.
- Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil Steril.* 2014;102:1502–7.

14. Esteves SC. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *Int Braz J Urol.* 2014;40:443–53.
15. Agarwal A, Allamaneni SSR. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril.* 2005;84:850–3.
16. Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod.* 2004;19:2052–9.
17. Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2009;91:1077–84.
18. Majzoub A, Agarwal A, Esteves SC. Clinical utility of sperm DNA damage in male infertility. *Panminerva Med.* 2019;61:118–27.
19. Panner Selvam MK, Agarwal A. A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. *Arab J Urol.* 2018;16:65–76.
20. Bach PV, Schlegel PN. Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI. *Basic Clin Androl.* 2016;26:1–10.
21. Agarwal A, Barbăroșie C, Ambar R, Finelli R. The impact of single- and double-strand DNA breaks in human spermatozoa on assisted reproduction. *Int J Mol Sci.* 2020;21:1–14.
22. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod.* 2012;27:652–8.
23. Zini A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med.* 2011;57:78–85.
24. Alkhalayal A, San Gabriel M, Zeidan K, Alrabeeah K, Noel D, McGraw R, et al. Sperm DNA and chromatin integrity in semen samples used for intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:1519–24.
25. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod.* 2007;22:174–9.
26. Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, et al. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod BioMed Online.* 2013;26:68–78.
27. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod BioMed Online.* 2015;30:120–7.
28. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2008;23:2663–8.
29. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell D. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl.* 2017;19:80–90.
30. Yang H, Li G, Jin H, Guo Y, Sun Y. The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. *Transl Androl Urol.* 2019;8:356–65.
31. Anifandis G, Bounartzis T, Messina CI, Dafopoulos K, Markandona R, Sotiriou S, et al. Sperm DNA fragmentation measured by Halosperm does not impact on embryo quality and ongoing pregnancy rates in IVF/ICSI treatments. *Andrologia.* 2015;47:295–302.
32. The practice committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril.* 2013;99:673–7.
33. Avendaño C, Oehninger S. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *J Androl.* 2011;32:356–63.
34. WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Heal Organ Press 2010; 5th Editio.
35. Balaban B, Sakkas D, Gardner DK. Laboratory procedures for human in vitro fertilization. *Semin Reprod Med.* 2014;32:272–82.
36. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Amengual M, Prada E, Cortés P, et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One.* 2012;7:e44679.
37. 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 test. *Am Soc Reprod Med.* 2005;84:833–42.
38. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology.* 2013;1:715–22.
39. García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl.* 2011;34:e546–53.
40. Gosálvez J, Caballero P, López-Fernández C, Ortega L, Guijarro JA, Fernández JL, et al. Can DNA fragmentation of neat or swim-up spermatozoa be used to predict pregnancy following ICSI of fertile oocyte donors? *Asian J Androl.* 2013;15:812–8.
41. Oguz Y, Guler I, Erdem A, Mutlu MF, Gumuslu S, Oktem M, et al. The effect of swim-up and gradient sperm preparation techniques on deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation in subfertile patients. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35:1083–9.
42. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health.* 2014;32:1.
43. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Staff T, Hoogendijk C, Mehnert C, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod BioMed Online.* 2003;7:477–84.
44. Agarwal A, Sharma R, Harlev A, Esteves SC. Effect of varicocele on semen characteristics according to the new 2010 World Health Organization criteria: a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl.* 2016;18:163–70.
45. Agarwal A, Deepinder F, Cocuzza M, Agarwal R, Short RA, Sabanegh E, et al. Efficacy of varicocelectomy in improving semen parameters: new meta-analytical approach. *Urology.* 2007;70:532–8.
46. Lara-Cerrillo S, Gual-Frau J, Benet J, Abad C, Prats J, Amengual MJ, et al. Microsurgical varicocelectomy effect on sperm telomere length, DNA fragmentation and seminal parameters. *Hum Fertil.* 2020;9:1–7.
47. 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.e8.
48. Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SEM. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril.* 2011;95:652–7.
49. Chi H, Kim S, Kim Y, Park J, Yoo C, Park I, et al. ICSI significantly improved the pregnancy rate of patients with a high sperm DNA fragmentation index. *Clin Exp Reprod Med.* 2017;44:132–40.
50. Coban O, Serdarogullari M, Yarkiner Z, Serakinci N. Investigating the level of DNA double-strand break in human spermatozoa and its relation to semen characteristics and IVF outcome using phosphohistone H2AX antibody as a biomarker. *Andrology.* 2019:1–6.
51. Paiano J, Wu W, Yamada S, Sciascia N, Callen E, Paola Cotrim A, et al. ATM and PRDM9 regulate SPO11-bound recombination intermediates during meiosis. *Nat Commun.* 2020;11:1–15.
52. Lange J, Pan J, Cole F, Thelen MP, Jasin M, Keeney S. ATM controls meiotic double-strand-break formation. *Nature.* 2011;479:237–40.

53. Keeney S, Lange J, Mohibullah N. Self-organization of meiotic recombination initiation: general principles and molecular pathways. *Annu Rev Genet.* 2014;48:187–214.
54. García-Rodríguez A, Gosálvez J, Agarwal A, Roy R, Johnston S. DNA damage and repair in human reproductive cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20:1–22.
55. Casanovas A, Ribas-Maynou J, Lara-Cerrillo S, Jimenez-Macedo AR, Hortal O, Benet J, et al. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertil Steril.* 2019;111:699–707.e1.
56. Green KA, Patounakis G, Dougherty MP, Werner MD, Scott RT, Franasiak JM. Sperm DNA fragmentation on the day of fertilization is not associated with embryologic or clinical outcomes after IVF/ICSI. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37:71–6.
57. Gunes S, Sertyel S. Sperm DNA damage and oocyte repair capability. *A Clin Guid to Sperm DNA Chromatin Damage.* 2018:321–46.
58. Eisenberg ML, Sapra KJ, Kim SD, Chen Z, Buck Louis GM. Semen quality and pregnancy loss in a contemporary cohort of couples recruited before conception: Data from the LIFE Study. *Fertil Steril.* 2017;108:613–9.
59. Marzano G, Chiriaco MS, Primiceri E, Dell'Aquila ME, Ramalho-Santos J, Zara V, et al. Sperm selection in assisted reproduction: a review of established methods and cutting-edge possibilities. *Biotechnol Adv.* 2020;40:107498.
60. Quinn MM, Jalalian L, Ribeiro S, Ona K, Demirci U, Cedars MI, et al. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum Reprod.* 2018;33:1388–93.
61. Xiao S, Riordon J, Simchi M, Lagunov A, Hannam T, Jarvi K, et al. FertDish: microfluidic sperm selection-in-a-dish for intracytoplasmic sperm injection. *Lab Chip.* 2021;21:775–83.
62. Parrella A, Keating D, Cheung S, Xie P, Stewart JD, Rosenwaks Z, et al. A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36:2057–66.
63. Smith GD, Takayama S. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction. *Mol Hum Reprod.* 2017;23:257–68.
64. Samuel R, Feng H, Jafek A, Despain D, Jenkins T, Gale B. Microfluidic-based sperm sorting & analysis for treatment of male infertility. *Transl Androl Urol.* 2018;7:S336–47.
65. Anbari F, Khalili MA, Sultan Ahamed AM, Mangoli E, Nabi A, Dehghanpour F, et al. Microfluidic sperm selection yields higher sperm quality compared to conventional method in ICSI program: a pilot study. *Syst Biol Reprod Med.* 2021;00:1–7.
66. Palermo GD, O'Neill CL, Chow S, Cheung S, Parrella A, Pereira N, et al. Intracytoplasmic sperm injection: State of the art in humans. *Reproduction.* 2017;154:F93–F110.
67. Franco J, Baruffi R, Mauri A, Petersen C, Oliveira J, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod BioMed Online.* 2008;17:42–5.
68. Gosálvez J, Migueles B, López-Fernández C, Sanchéz-Martín F, Sánchez-Martín P. Single sperm selection and DNA fragmentation analysis: the case of MSOME/IMSI. *Nat Sci.* 2013;05:7–14.
69. Pastuszek E, Kiewisz J, Skowronska P, Liss J, Lukaszuk M, Bruszczyńska A, et al. An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human spermatozoa on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay. *Andrology.* 2017;5:392–8.
70. Hammoud I, Boitrelle F, Ferfour F, Vialard F, Bergere M, Wainer B, et al. Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates. *Andrologia.* 2013;45:163–70.
71. Luna D, Hilario R, Dueñas-Chacón J, Romero R, Zavala P, Villegas L, et al. The IMSI procedure improves laboratory and clinical outcomes without compromising the aneuploidy rate when compared to the classical ICSI procedure. *Clin Med Insights Reprod Heal.* 2015;9:CMRH.S33032.
72. Wilding M, Coppola G, Di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28:253–62.
73. Duran-Retamal M, Morris G, Achilli C, Gaunt M, Theodorou E, Saab W, et al. Live birth and miscarriage rate following intracytoplasmic morphologically selected sperm injection vs intracytoplasmic sperm injection: an updated systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2019:1–10.
74. Setti AS, De Almeida Ferreira Braga DP, Iaconelli A, Aoki T, Borges E. Twelve years of MSOME and IMSI: a review. *Reprod BioMed Online.* 2013;27:338–52.
75. Teixeira D, Barbosa M, Ferriani R, Navarro P, Nasti C. Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction (Review). *Cochrane Libr.* 2013.
76. López G, Lafuente R, Checa MA, Carreras R, Brassesco M. Diagnostic value of sperm DNA fragmentation and sperm high-magnification for predicting outcome of assisted reproduction treatment. *Asian J Androl.* 2013;15:790–4.
77. Simopoulou M, Sfakianoudis K, Antoniou N, Maziotis E, Rapani A, Bakas P, et al. Making IVF more effective through the evolution of prediction models: is prognosis the missing piece of the puzzle? *Syst Biol Reprod Med.* 2018;64:305–23.
78. Bounartzi T, Dafopoulos K, Anifandis G, Messini CI, Koutsonikou C, Kouris S, et al. Pregnancy prediction by free sperm DNA and sperm DNA fragmentation in semen specimens of IVF/ICSI-ET patients. *Hum Fertil.* 2016;19:56–62.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.1.3. Proyecto 1.3: Estudio de la fragmentación del ADN espermático sobre espermatozoides ICSI-N

Los resultados del **Proyecto 1.3** se han obtenido tras el estudio de muestras de eyaculado y muestras tras un Swim-up de cinco pacientes infértiles, así como un total de 94 espermatozoides ICSI-S y 567 espermatozoides **ICSI-N**. Los espermatozoides ICSI-N se dividieron en diferentes categorías según sus características de morfología y motilidad: i) ICSI-N con alteraciones en la cabeza, pero móviles; ii) ICSI-N con alteraciones en la pieza intermedia, pero móviles y iii) ICSI-N con morfología normal, pero inmóviles.

En cuanto a la fragmentación del tipo **SSB**, tras la realización del test Comet alcalino sobre las muestras de eyaculado, Swim-up e ICSI-S, los resultados obtenidos son coherentes con los valores obtenidos en el Proyecto 1.2 (Figuras 1 y 2a en el artículo publicado correspondiente al Proyecto 1.2). Hay una disminución significativa de los valores de SSB en las muestras de Swim-up e ICSI-S respecto al eyaculado ($p < 0,05$ en ambos casos). Además, los ICSI-S también han mostrado diferencias significativas respecto al Swim-up ($p=0,043$). Los ICSI-N han mostrado valores de SSB estadísticamente superiores a los ICSI-S ($p < 0,05$ en todos los casos) (Tabla 6 y Figura 22). Los espermatozoides **ICSI-N con morfología de la cabeza alterada** presentaron un incremento medio del 43,26% respecto los ICSI-S. Los espermatozoides **ICSI-N con alteraciones en la pieza intermedia** mostraron un incremento del 50,67% respecto los ICSI-S. Por último, los espermatozoides **ICSI-N inmóviles** mostraron un incremento del 64,91% respecto los ICSI-S.

En cuanto a la fragmentación del tipo **DSB**, tras la realización del test Comet neutro sobre las muestras de eyaculado, Swim-up e ICSI-S, los resultados obtenidos también son coherentes con los valores obtenidos anteriormente (Figuras 1 y 2a en el artículo publicado correspondiente al Proyecto 1.2). Así pues, no se han observado diferencias entre los valores de DSB en estos tres grupos ($p > 0,05$ en todas las comparaciones). Por el contrario, las tres categorías de

espermatozoides ICSI-N mostraron valores de DSB estadísticamente superiores a los ICSI-S ($p < 0,05$ en todos los casos) (Tabla 1 y Figura 2). Los espermatozoides **ICSI-N con morfología de la cabeza alterada** presentaron un incremento medio del 22,43% respecto los ICSI-S. Los espermatozoides **ICSI-N con alteraciones en la pieza intermedia** mostraron un incremento del 16,92% respecto los ICSI-S. Por último, los espermatozoides **ICSI-N inmóviles** mostraron un incremento del 15,81% respecto los ICSI-S.

Tabla 6. Resultados de fragmentación de cadena doble y cadena sencilla en las muestras de eyaculado, Swim-up, ICSI-S e ICSI-N con diferentes alteraciones.

Muestra	Fragmentación de cadena sencilla (media % \pm SD)	Fragmentación de cadena doble (media % \pm SD)
Eyaculado	40,40 \pm 8,76	62,60 \pm 8,59
Swim-up	32,00 \pm 9,67 ^a	60,80 \pm 9,73
ICSI-S	18,30 \pm 6,20 ^{a,b}	59,64 \pm 6,44
ICSI-N morfología cabeza alterada	61,56 \pm 8,20 ^{a,b,c}	82,07 \pm 6,46 ^{a,b,c}
ICSI-N pieza intermedia alterada	68,97 \pm 7,18 ^{a,b,c}	76,56 \pm 7,03 ^{a,b,c,d}
ICSI-N inmóviles	83,21 \pm 8,24 ^{a,b,c,d,e}	75,45 \pm 7,37 ^c

Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a las muestras en casillas superiores:

^a Respecto el eyaculado.

^b Respecto el Swim-up.

^c Respecto los espermatozoides ICSI-S.

^d Respecto los espermatozoides ICSI-N con morfología de la cabeza alterada.

^e Respecto los espermatozoides ICSI-N con la pieza intermedia alterada.

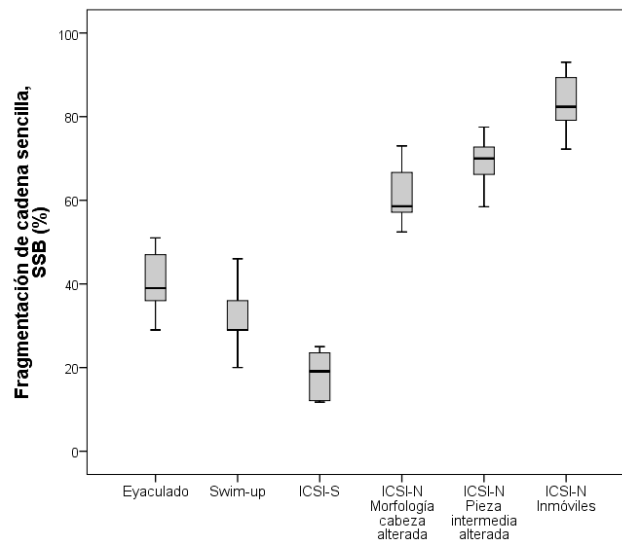


Figura 22. Valores de fragmentación de cadena sencilla (SSB) en muestras de eyaculado, tras un Swim-up, espermatozoides seleccionados para (ICSI-S) y espermatozoides descartados para ICSI (ICSI-N) con diferentes alteraciones.

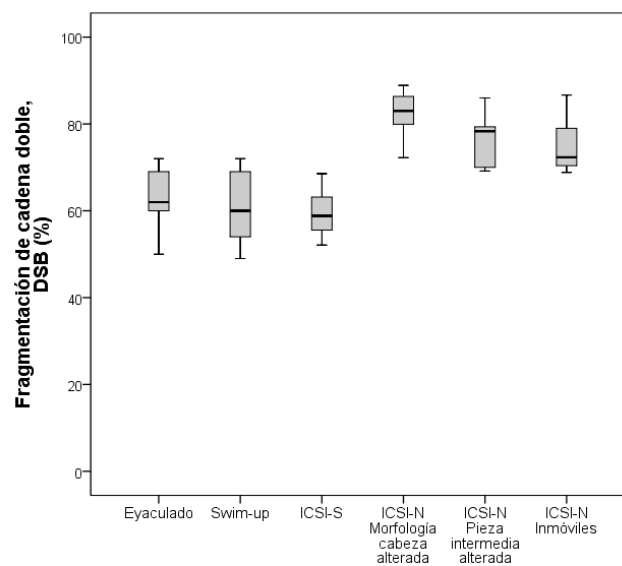


Figura 23. Valores de fragmentación de cadena doble (DSB) en muestras de eyaculado, tras un Swim-up, espermatozoides seleccionados para (ICSI-S) y espermatozoides descartados para ICSI (ICSI-N) con diferentes alteraciones.

4.2. Proyecto 2

Los resultados finales correspondientes al **Proyecto 2** se han recogido en un artículo que actualmente está en proceso de revisión.

- **Título:** *The effect of sperm DNA fragmentation and microfluidic sperm sorting on fertilization and embryonic euploidy rates.*
- **Autores:** Sandra Lara-Cerrillo; Ana Raquel Jiménez Macedo; Olga Hortal Codina; Candela Rosado-Iglesias; Tania Lacruz-Ruiz; Joan Carrera Rotllan y Agustín García-Peiró.
- **En proceso de revisión por parte de la revista:**

Además, los resultados de este estudio se han presentado en el siguiente congreso nacional:

- X congreso nacional bianual de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). 2019. Póster.

La versión en revisión se muestra a continuación.

The effect of sperm DNA fragmentation and microfluidic sperm sorting on fertilization and embryonic euploidy rates.

Sandra Lara-Cerrillo^{a*}, Ana Raquel Jiménez-Macedo^{b*}, Olga Hortal^b, Candela Rosado-Iglesias^a, Tania Lacruz-Ruiz^a, Joan Carrera^b and Agustín García-Peiró^a.

*Authors contributed equally.

^a CIMAB, Barcelona Male Infertility Centre. C/Vallcorba 1-3, Sant Quirze del Vallés (08192 Barcelona) Spain.

^b UEG, Unitat d'Endocrinologia Ginecològica. C/Bisbe Torras i Bages 4, Vic (08500 Barcelona) Spain.

Corresponding author:

PhD Agustín García Peiró

CIMAB, Barcelona Male Infertility Centre

C/Vallcorba 1A-3A LOCAL

08192 Sant Quirze del Vallès (Barcelona, Spain)

(+34) 93 858 76 14 | info@cimab.es

Abstract

Objective: To study the effect of single- and double-strand breaks (SSB and DSB) on fertilization and embryonic euploidy rates. The effect of a microfluidic sperm-sorting (MSS) device was also studied.

Design: Retrospective cohort study.

Setting: University spin-off and private reproduction center.

Patients: 167 infertile couples.

Interventions: ICSI treatments.

Main Outcome Measures: SSB and DSB were analyzed using the alkaline and the neutral CometAssay, respectively. Fertilization and embryonic euploidy rates were studied according to SSB and DSB values, respectively.

Results: Fertilization rates significantly decreased when patients presented high SSB values and Density gradients were used for semen preparation (58.49%), as compared to patients with normal values (70.84%). When the ZyMöt™ ICSI microfluidic device was used to filter samples with altered SSB values, fertilization rates fully recovered (69.71%). Euploidy rates significantly decreased when patients presented high DSB values and Density gradients were used (36.84%), as compared to patients with normal values (60.00%). The MSS device for semen preparation partially recovered this euploidy rate (44.59%). Considering women's age, couples including men with normal DSB values and young women (<35 years old) obtained a mean of 3.00 ± 1.00 euploid embryos. Older women (≥ 35 years old) obtained significantly lower euploid blastocysts (0.75 ± 0.96). Moreover, when males presented altered DSB values, both younger and older women showed a decrease in euploidy rates (1.00 ± 0.00 and 0.57 ± 0.65 , respectively). The use of the MSS device to reduce DSB values resulted in a significant increase of euploid embryos when women were under and above 35 years old (4.20 ± 0.84 and 0.67 ± 1.03 , respectively).

Conclusion: The presence of SSB in semen samples leads to significantly lower fertilization rates while the presence of DSB leads to lower embryonic euploidy rates, especially when women are above 35 years old. The use of the ZyMöt™ ICSI microfluidic device to reduce SSB and DSB allow a full recovery of fertilization and euploidy rates when women are under 35 years of age. When women are older than 35 years old, the MSS result in a partial recovery of embryonic euploidy.

Key words: Single-strand breaks (SSB); double-strand breaks (DSB); fertilization rate; euploidy rate; microfluidic sperm sorting (MSS).

Introduction

Infertility is defined by the World Health Organization as the failure to achieve a pregnancy after 12 months of regular and unprotected sexual intercourse (1). This condition affects about 15% of couples in developed countries and presents an equal contribution of the male and the female factor (1). Assisted reproductive techniques (ART) may help infertile couples to conceive a healthy child. Especially, the Intracytoplasmic sperm injection technique (ICSI) has allowed clinicians to treat the severe male factor since its development in the 90s (2).

Traditional semen analysis includes the study of sperm concentration, motility and morphology, but it might not be conclusive to obtain a diagnosis and fails as a predictor of success in ART treatments (3). Special attention has been paid to sperm DNA integrity testing during the last decade. This measure has shown a clear relationship with male infertility and ART outcomes (4). There are two different types of sperm DNA damage with different roles and contributions to infertility (4,5). Firstly, single-strand breaks (SSB) are mainly produced by reactive oxygen species (ROS) throughout all the genome in an extensive manner (6). This damage seems to be a key factor affecting fertilization rates (7–9) and showed to reduce the chances to obtain a pregnancy through natural or intrauterine insemination (5,10). ROS also cause membrane damage through the peroxidation of lipids and the alteration of the normal function of mitochondria, changes that ultimately impair sperm motility (11). Secondly, double-strand breaks (DSB) are mainly produced through the action of Spo11 during male meiosis to allow homologous recombination and the hypercondensation of sperm DNA (12). The presence of a high number of DSB has been related to a higher risk of pregnancy loss (13,14) and reduced embryo kinetics (15).

Early pregnancy loss may also be related to an abnormal number of chromosomes in the embryo (16). The presence of aneuploidies is commonly related to an incorrect segregation process in oocytes that might increase with women's age, especially after the age of 35 (17,18). DSB in sperm DNA can also induce aneuploidies and structural variations (19,20). These chromosomal abnormalities might be tolerated by early embryos because cell-cycle checkpoints and apoptotic pathways are poorly activated at this stage (19). The effect of genetic abnormalities might appear when embryos progress, leading to errors in chromosome segregation and resulting in

reduced embryo kinetics or cell-cycle arrest (15,20). In this regard, the preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) allows clinicians to detect alterations in embryos (21,22).

In view of the potential consequences of sperm DNA damage in embryos, those sperm selection methods that allow the reduction of SSB and DSB might be of great interest. A recent publication from our group showed that SSB values in semen samples can be significantly reduced through the Swim-up procedure (23). In that study, it was shown that the selection of motile spermatozoa by embryologists during ICSI cycles seems to intrinsically imply selecting a cell with low levels of SSB. In sharp contrast, DSB cannot be reduced through a Swim-up or during ICSI procedures (23). Regarding semen preparation, new microfluidic sperm sorting (MSS) devices have recently emerged. One example is the ZyMöt™ICSI device (previously known as FertileChip; DxNow Inc.; Gaithersburg, MD, USA). This device has been shown to efficiently select motile sperm and to reduce sperm DNA damage by mimicking the natural sperm selection process that happens inside the female reproductive tract (24,25). Moreover, this MSS device has recently been shown to increase reproductive outcomes after ICSI treatments when male patients presented high DSB values (26).

The aim of this study was to evaluate the effect of high SSB and DSB values on fertilization rates and embryonic euploidy. Moreover, we studied the potential beneficial effect of the ZyMöt™ICSI microfluidic device to increase these rates.

Materials and methods

Samples and groups

This retrospective study included 167 ICSI cycles performed at the UEG fertility center (Unitat d'Endocrinologia Ginecològica; Vic, Barcelona, Spain). Cycles were included independently of women's age and when men had a diagnostic of high SSB or DSB values. Semen preparation was performed using Density gradients or the ZyMöt™ICSI microfluidic device (DxNow Inc.; Gaithersburg, MD, USA).

To study fertilization rates, groups were defined according to SSB values: men in Groups A (n = 33) and B (n = 72) presented normal SSB values (< 45%), while men in Groups C (n = 37) and D (n = 25) presented altered SSB values (≥ 45%, internal cut-off values). In Groups A and C, Density gradients were used for semen preparation, while the MSS device was used in Groups B and D.

To study euploidy rates, groups were defined according to DSB values: men in Groups 1 (n = 22) and 2 (n = 22) presented normal DSB values (< 60%), while men in Groups 3 (n = 48) and 4 (n = 75) presented altered DSB values (\geq 60%, internal cut-off values). In Groups 1 and 3, Density gradients were used for semen preparation, while the MSS device was used in Groups 2 and 4.

Couples were excluded from the study when men presented other fertility impairments apart from DNA damage, such as genitourinary infections, karyotype alterations or severe alterations of semen parameters (27), or when women presented other infertility conditions apart from advanced age, such as endometriosis, polycystic ovary, hormonal disturbances, karyotype alterations or tubal factors. All patients signed informed consent forms and the study was approved by the Corporació Sanitària Parc Taulí Ethics Committee (Ref: 2017902).

Sperm DNA fragmentation

The alkaline and neutral Comet assays (CometFertility; CIMAB center; Sant Quirze del Vallés, Barcelona, Spain) were performed under specifically designed conditions to allow the detection of SSB and DSB, respectively (5). Briefly, semen samples were mixed 1:2 (v/v) with 1% low-melting-point agarose (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), fixed on a slide, jellified at 4°C and immersed in two consecutive lysis solutions. The alkaline Comet electrophoresis was performed at 20V for 4 minutes in 0.03M NaOH buffer (pH 12.2) (Sigma-Aldrich) after a denaturing treatment. The neutral Comet electrophoresis was performed at 20V for 12.5 minutes in 1x Tris-borate-EDTA (TBE) buffer (pH 8.5) (Sigma-Aldrich). Slides were washed in 0.4M Trizma base neutralization solution (pH 7.5) (Sigma-Aldrich), dehydrated in ethanol series and dried horizontally. Samples were stained with DAPI (Diamond Antifade Mountant with DAPI; ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, USA) and 200 cells were classified as normal or fragmented based on the tail-length.

Ovarian stimulation and oocyte retrieval

Ovarian stimulation was induced with follicle-stimulating hormone. Luteinizing hormone (LH) and/or urine gonadotropins were added depending on patient's age and basal LH values. Doses were calculated depending on ovarian reserve, age, body mass index and possible response to a previous cycle. Short protocols were used for ovarian maturation, including gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists, triggering with an agonist 34-36h before egg collection.

Cumulus-oocyte complexes were retrieved after GnRH injection and washed using MOPS Plus (Vitrolife; Gothenburg, Sweden) and cultured in G-IVF fertilization medium (Vitrolife) covered by mineral oil (Ovoil, Vitrolife) inside an incubator (K-systems; Cooper Surgical; Trumbull, CT, USA) at 7.2% CO₂, 5% O₂, and 37°C for 2-3h before denudation.

Sperm preparation

All semen samples were obtained through masturbation after 1-2 days of sexual abstinence.

In Groups A, C, 1 and 3, semen was prepared using Density gradients at 40% and 80% of Isolate Sperm Separation Medium and Washing Medium (Fujifilm Irvine Scientific Inc.; Santa Ana, CA, USA). Tubes were centrifuged for 20 minutes at 1100rpm. The pellet was placed in a new tube containing 5mL of washing medium and centrifuged for 10 minutes at 1300rpm. The pellet was resuspended in a small volume of washing medium.

In Groups B, D, 2 and 4, the ZyMöt™ICSI microfluidic system was used for semen preparation. First, each channel was hydrated by injecting 13µL of Sperm Washing Medium. Depending on sperm concentration, 1-2.5µL of the raw semen sample were slowly injected through the inlet port. Ports were sealed using mineral oil. The MSS device was heated for 20-30 minutes at 37°C and 2µL of sperm were recovered from each outlet port using a micropipette.

Fertilization procedure and embryo culture

ICSI was performed four hours after oocyte collection using MOPS Plus medium (Vitrolife). Injected oocytes were placed on a pre-equilibrated Primo Vision culture slide (Vitrolife) containing GTL medium (Vitrolife). The culture was performed at 7.2% CO₂, 5% O₂, and 37°C for 5-6 days. Embryonic morphology was evaluated according to Spanish guidelines (28). Good-quality blastocysts were vitrified with Freezing Medium (Fujifilm Irvine Scientific Inc.) according to the manufacturer's instructions and stored in a liquid nitrogen tank until thawing, or were analyzed through PGT-A before vitrification.

Preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A)

Assisted hatching was performed on day +3 post-insemination to facilitate a subsequent biopsy on days +5/6. Good-quality blastocysts were biopsied by drilling a hole in the zona pellucida using a laser (RI Saturn 5TM; Cooper Surgical). Suction was applied to the trophectoderm and 4-6 cells were removed. After trophectoderm biopsy, blastocysts were vitrified using Freezing

Medium (Irvine Scientific) and stored in liquid nitrogen until their transfer. Biopsies were sent to an external genetic laboratory for PGT-A analysis.

Embryo transfer

Embryo transfers were performed within the implantation window determined by the LH peak. Vitri-fied blastocysts were thawed according to the manufacturer's instructions and were cultured for 2-3h in GTL medium at 7.2% CO₂, 5% O₂, and 37°C. Finally, embryos were placed inside the uterus of the patient.

Statistics

A descriptive analysis was performed for all groups. Normality was evaluated using the Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. The Mann-Whitney U test was used to evaluate differences between groups. Statistical significance was set at $\alpha=0.05$.

Results

Fertilization rates and SSB damage

Women were of similar age in Groups A, B, C and D ($p>0.05$ for all comparisons; Table 1). There were significant differences in SSB values between Groups A and B and Groups C and D ($p>0.05$ for all comparisons). Fertilization rates showed differences between Groups A, B and D and Group C ($p=0.032$, $p=0.007$ and $p=0.037$, respectively). There were no differences between Groups A and B and Group D ($p>0.05$ for both comparisons). Group C including patients with altered SSB values showed a 12.35% reduction in the fertilization rate, as compared with patients presenting normal values (Group A). When the MSS device was used in patients presenting altered SSB values (Group D), the mean fertilization rate showed an 11.22% increase, as compared with Group C ($p<0.05$; Table 1).

Euploidy rates and DSB damage

The mean age of women from Groups 1, 2, 3 and 4 was not statistically different ($p>0.05$ for all comparisons; Table 2). There were statistically significant differences in DSB values between Groups 1 and 2 and Groups 3 and 4 ($p>0.05$ for all comparisons). A total of 299 embryos were obtained from all groups, showing similar means per cycle ($p>0.05$ for all comparisons). PGT-A was performed on 148 embryos (Table 2). Group 3, including patients with altered values of DSB using Density gradients, showed a reduction of 23.16% in embryonic euploidy, when compared

with patients with normal values also using Density gradients (Group 1) ($p=0.023$) and a reduction of 25.66%, as compared with patients using the MSS device (Group 2) ($p=0.049$). In Group 4, including patients with altered DSB values, the use of the MSS device increased 7.75% the euploidy rate, when compared with Group 3, although the difference was not significant ($p=0.905$). There were no differences between Group 1 and Group 2 regarding euploidy rates, although a 2.5% increase was observed ($p=0.552$). There were no differences between euploidy rates between Groups 1 and 2 and Group 4 ($p=0.399$ and $p=0.697$, respectively).

Embryonic euploidy was also examined according to women's age and DSB values (Table 3). Couples including women under the age of 35, whose partner presented normal DSB values, obtained more euploid embryos, as compared with couples including women over 35 years ($p=0.048$). When men presented altered DSB values and the semen was prepared using Density gradients, fewer euploid embryos were obtained when women were under 35 years compared to patients with normal DSB values ($p=0.037$). When women were over 35 years, a trend for fewer euploid embryos was observed, as compared to cases with normal DSB values ($p=0.068$) or cases with younger women ($p=0.200$). The use of the MSS device to reduce DSB values increased the number of euploid blastocysts in couples where women were under 35 ($p=0.013$) and over 35 years ($p=0.012$), as compared with cases not using the MSS device. Among these cases (altered DSB values and using the MSS), couples where women were over 35 years showed fewer euploid blastocysts, when compared with younger women ($p<0.001$).

Discussion

The effect of sperm DNA fragmentation on male fertility has been widely described and one of the main findings observed is the importance of discriminating between SSB and DSB (4). Both types of DNA damage have different origins, effects on fertility and, consequently, should have different treatment strategies (23,29). In this sense, the main objective of this study was to evaluate the effect of SSB and DSB on fertilization and embryonic euploidy rates, respectively, combined with the potential beneficial effect of an MSS device.

In agreement with previous investigations, a significant 12.35% reduction in fertilization rates was found when men presented high SSB values in the semen sample (Group C), as compared with men presenting normal SSB values (Group A; Table 1) (7–9). This finding could indicate that embryos containing a high number of SSB in the paternal genome present difficulties to progress from the pronuclear stage. These results in couples undergoing ICSI cycles could be in agreement

with previous research showing an inverse relationship between high SSB values, or high ROS values, and the achievement of a natural pregnancy or during artificial insemination procedures (6,30). In these cases, no pregnancies might be recorded because fertilization would be blocked when a high number of SSB affect sperm DNA. DNA damage from the paternal genome should be repaired after natural or artificial fertilization since oocytes maintain their repair capacity (31). However, when the number of SSB overcomes the oocyte's repair capacity, embryo development can be compromised.

It is also important to consider the potential iatrogenic damage on DNA produced by semen preparation methods in ART, such as Density gradients, especially when insemination is forced using the ICSI procedure. This technique implies bypassing the natural selection process that happens inside a woman's reproductive track and the natural fertilization process itself. Although not fully understood, this natural process might increase the probabilities that a healthy spermatozoon reaches and fertilizes the oocyte (32). To inject the best spermatozoon from a semen sample during ICSI cycles, the ejaculate is processed to separate seminal fluids and dead spermatozoa from motile cells. However, some authors found that centrifugation steps during these procedures can increase ROS in cells and, therefore, increase lipid peroxidation and SSB values (33).

The use of MSS devices is of great interest to avoid generating iatrogenic damage related to conventional semen preparations (34,35). For example, the ZyMöt™ICSI is a microfluidic device that implies a simple and cost-effective methodology and does not require centrifugation steps and minimizes the sample manipulation. Moreover, this MSS significantly reduces the proportion of sperm with SSB and DSB and increases sperm progressive motility (24,26,36). Our results consistently showed that the ZyMöt™ICSI device led to a significant 11.22% increase in the fertilization rate when men presented altered SSB values (Group D), as compared with those cases using Density gradients (Group C). The fertilization rates obtained after using the MSS device (69.71%, Group D) reached a similar value as patients with normal SSB values (70.84%; Group A) (Table 1).

After fertilization, PGT-A can detect aneuploidies in embryos. The results show a significant 23.16% reduction in the euploidy rate when patients presented altered DSB values (Group 3), as compared with patients with normal values (Group 1; Table 2). These results could be in agreement with previous investigations that found reduced embryo kinetics, cell cycle arrest

and implantation failures or recurrent miscarriages related to DSB in sperm DNA (4,13,15). This damage is mainly produced by enzymes such as Spo11 during male meiosis to allow homologous recombination and the hypercondensation of DNA (12). DSB can also be produced by nuclear endonucleases when chromatin is previously compromised because of an abnormal histone:protamine replacement (4). A recent publication showed that conventional semen preparation methods based on sperm motility such as the Swim-up procedure and the selection of motile sperm during ICSI treatments does not reduce DSB values (23). Consequently, when a sample shows high DSB values, it is highly probable that the microinjected sperm is affected which, ultimately, compromises the viability of the embryo (4). After fertilization DSB lack complementary chains to be repaired because the maternal and paternal pronuclei are separated during the first stage of embryonic development. Therefore, the repair of paternal DSB is error-prone and could lead to chromosomal aneuploidies and rearrangements (31).

The potential beneficial effect of the ZyMöt™ ICSI microfluidic device on embryonic euploidy was also evaluated. Patients presenting high DSB values increased 7.75% the euploidy rate when the MSS device was used (Group 4), as compared with cases using Density gradients (Group 3) (Table 2). Patients with normal DSB values (Group 1) and patients with altered DSB values using the MSS device (Group 4) did not show statistical differences. However, the euploidy rate was 15.41% lower in Group 4. As mentioned before, MSS does not include centrifugation steps that could produce iatrogenic DNA damage. Moreover, this device has been shown to efficiently filter sperm with progressive motility and lower values of SSB and DSB due to its microfluidic design that mimics the female reproductive tract (24–26). However, despite its promising results reducing DNA damage, this MSS device is unable to completely filter all spermatozoa with DSB in their DNA, and a small amount of altered sperm could reach the outlet port (24,26). Embryologists could select these sperm to fertilize oocytes given that these cells would be motile (23). If these DSB are not properly repaired after fertilization, aneuploidies related to the sperm could be present in embryos. In fact, only one break that is not repaired could be responsible for the loss of a chromosome fragment (19).

The effect of women's age on embryonic euploidy was also evaluated together with the effect of DSB (Table 3). Couples including men with normal DSB values and women under 35 years obtained significantly more euploid embryos (3.00 ± 1.00) than women over 35 years (0.75 ± 0.96). This finding is consistent with previous investigations showing that the presence of aneuploidies in oocytes increases, and its repair capacity declines, from the age of 35 (16,31). The observed

reduction in euploidy rates when women are over 35 years old could be associated with a female factor. On the contrary, couples including women under 35 years old and men presenting altered DSB values obtained significantly fewer euploid embryos (1.00 ± 0.00) than couples with normal DSB values (Table 3). In this case, the decrease in euploidy could be attributed to a male factor. Interestingly, there are no differences in the euploidy rate obtained in couples with only a female factor related to age and couples with only a male factor related to high DSB values. Consistently, the results suggest that there is an equivalent contribution of the female and the male factor to euploidy in embryos. In cases with both female and male factors (women over 35 years and high DSB values), the euploidy rate is even fewer (0.57 ± 0.65) than the previous groups.

In cases where the ZyMöt™ ICSI microfluidic device was used, the number of euploid blastocysts rose to 4.20 ± 0.84 in couples including women under 35 years (Table 3). This value is higher than the result obtained from couples with normal DSB values although no statistical differences were found. The use of Density gradients resulted in 1.00 ± 0.00 euploid embryos, even if the women were young (Table 3). When women were over 35 years couples obtained 0.57 ± 0.65 euploid embryos when Density gradients were used, and 0.67 ± 1.03 euploid embryos when the MSS device was used. In these cases (women above 35 years and high DSB values), only the male factor can be partially diminished using the ZyMöt™ ICSI microfluidic device if oocyte donation is not considered. Also, these results suggest that the partial increase in the euploidy rate from Group 4 compared to Group 3 in Table 2 is biased by women's age. Those couples using the ZyMöt™ ICSI microfluidic device to reduce high DSB values and women under 35 years old could expect significantly better euploidy rates than couples including older women.

Conclusions

Results show that high values of SSB and DSB in sperm lead to significantly lower fertilization and euploidy rates, respectively. When women were over 35 years, the decrease in embryonic euploidy was even more remarkable. The use of the ZyMöt™ ICSI device to reduce sperm DNA damage led to a complete recovery of fertilization and euploidy rates when women were under 35 years of age, and to a partial recovery of euploidy when women were over 35 years.

Acknowledgements

We thank Mr. Charles J. Simmons for the final English revision of the manuscript.

Conflict of interest

PhD Agustín García-Peiró have commercial interest in the ZyMōt™ICSI microfluidic sperm sorting device and the Comet Assay for sperm DNA fragmentation testing. None of the other authors have a conflict of interest to declare.

Funding

This project has been financed by the CIMAB center and supported by an Industrial Doctorate grant (Doctorados Industriales) given by the Economy, Industry and Competitiveness Ministry of Spain (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad) and the State Investigation Agency (Agencia Estatal de Investigación) (Ref.: DI-16-08429).

References

1. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 2018;62(2):2–10.
2. Palermo GD, Cohen J, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: A powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil Steril* 1996;65(5):899–908.
3. Esteves SC. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *Int Braz J Urol* 2014;40(4):443–53.
4. Agarwal A, Barbăroșie C, Ambar R, Finelli R. The impact of single- and double-strand DNA breaks in human spermatozoa on assisted reproduction. *Int J Mol Sci* 2020;21(11):1–14.
5. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013;1(5):715–22.
6. Aitken R, Bronson R, Smith T, De Lullis G. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod* 2013;19(8):475–85.
7. Høst E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. DNA strand breaks in human spermatozoa: Correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79(3):189–93.

8. Avendaño C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2010;94(2):549–57.
9. Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, De Los Santos MJ, et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006;85(2):371–83.
10. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22(1):174–9.
11. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health* 2014;32(1):1–17.
12. Keeney S, Lange J, Mohibullah N. Self-Organization of Meiotic Recombination Initiation: General Principles and Molecular Pathways. *Annu Rev Genet* 2014;48:187–214.
13. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernandez-Encinas A, Amengual M, Prada E, Cortés P, et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* 2012;7(9).
14. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;23(12):2663–8.
15. Casanovas A, Ribas-Maynou J, Lara-Cerrillo S, Jimenez-Macedo AR, Hortal O, Benet J, et al. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertil Steril* 2019;111(4):699-707.e1.
16. Blyth U, Craciunas L, Choudhary M, Hudson G. Maternal germline factors associated with aneuploid pregnancy loss: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2021;00(0):1–19.
17. MacLennan M, Crichton JH, Playfoot CJ, Adams IR. Oocyte development, meiosis and aneuploidy. *Semin Cell Dev Biol* 2015;45:68–76.
18. Mikwar M, MacFarlane AJ, Marchetti F. Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 2020;785:108320.
19. Middelkamp S, van Tol HTA, Spierings DCJ, Boymans S, Guryev V, Roelen BAJ, et al. Sperm DNA damage causes genomic instability in early embryonic development. *bioRxiv* 2019;(April):1–12.
20. Nili HA, Mozdarani H, Pellestor F. Impact of DNA damage on the frequency of sperm chromosomal aneuploidy in normal and subfertile men. *Iran Biomed J* 2011;15(4):122–9.

21. Enciso M, Alfarawati S, Wells D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod* 2013;28(6):1707–15.
22. Fesahat F, Montazeri F, Hoseini SM. Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *J Gynecol Obstet Hum Reprod [Internet]* 2020;49(5):101723.
23. Lara-Cerrillo S, Ribas-Maynou J, Rosado-Iglesias C, Lacruz-Ruiz T, Benet J, García-Peiró A. Sperm selection during ICSI treatments reduces single- but not double-strand DNA break values compared to the semen sample. *J Assist Reprod Genet* 2021;38(5):1187–96.
24. Quinn MM, Jalalian L, Ribeiro S, Ona K, Demirci U, Cedars MI, et al. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to Density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum Reprod* 2018;33(8):1388–93.
25. Samuel R, Feng H, Jafek A, Despain D, Jenkins T, Gale B. Microfluidic-based sperm sorting & analysis for treatment of male infertility. *Transl Androl Urol* 2018;7(1):S336–47.
26. Pujol Masana A, García-Peiró A, Ribas-Maynou J, Lafuente R, Mataró D, Vassena R. A microfluidic sperm sorting device reduces the proportion of sperm with double strand DNA fragmentation. *Zygote* 2021;(in press).
27. WHO. WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen. World Heal Organ Press 2010;5th Ed.
28. ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica: criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos [Internet]. *Cuad. Embriol. clínica ASEBIR*. 2015 [cited 2021 Jul 31];9–20.
29. Enciso M, Iglesias M, Galán I, Sarasa J, Gosálvez A, Gosálvez J. The ability of sperm selection techniques to remove single- or double-strand DNA damage. *Asian J Androl* 2011;13(5):764–8.
30. Cho CL, Agarwal A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab J Urol* 2018;16(1):21–34.
31. García-Rodríguez A, Gosálvez J, Agarwal A, Roy R, Johnston S. DNA damage and repair in human reproductive cells. *Int J Mol Sci* 2019;20(1):1–22.
32. Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CLR. Sperm selection in natural conception: What can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Hum Reprod Update* 2015;21(6):711–26.
33. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: Protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998;4(5):439–45.

34. Smith GD, Takayama S. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction. *Mol Hum Reprod* 2017;23(4):257–68.
35. Gode F, Bodur T, Gunturkun F, Gurbuz AS, Tamer B, Pala I, et al. Comparison of microfluid sperm sorting chip and Density gradient methods for use in intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril* 2019;112(5):842-848.e1.
36. Shirota K, Yotsumoto F, Itoh H, Obama H, Hidaka N, Nakajima K, et al. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertil Steril* 2016;105(2):315-321.e1.

Tables

Table 1. Fertilization rates in Groups A to D according to the observed single-strand breaks (SSB) values in semen samples and the semen preparation method (Density gradients or microfluidic sperm sorting (MSS)).

SSB values	Normal (< 45%)		Altered (≥ 45%)	
	Density gradient	MSS	Density gradient	MSS
Semen preparation				
Group	A	B	C	D
Number of cases	33	72	37	25
SSB value (%), mean ± SD	35.24 ± 7.48 ^{a,b}	32.64 ± 7.53 ^{a,b}	57.57 ± 9.98	58.84 ± 10.31
Women's age (years), mean ± SD	36.73 ± 4.34	37.22 ± 4.08	35.77 ± 4.55	35.00 ± 3.82
Fertilization rate (%), mean ± SD	70.84 ± 23.44 ^a	71.83 ± 20.30 ^a	58.49 ± 23.68	69.71 ± 25.04 ^a

^a Different compared with Group C (p < 0.05).

^b Different compared with Group D (p < 0.05).

Table 2. Embryonic euploidy in Groups 1 to 4 according to the observed double-strand breaks (DSB) values in semen samples and the semen preparation method (Density gradients or microfluidic sperm sorting (MSS)).

DSB values	Normal (< 60%)		Altered (≥ 60%)	
	Density gradient	MSS	Density gradient	MSS
Semen preparation				
Group	1	2	3	4
Number of cases	22	22	48	75
DSB value (%), mean ± SD	47.14 ± 8.54 ^{a,b}	47.05 ± 7.90 ^{a,b}	73.31 ± 8.41	72.47 ± 8.17
Women's age (years), mean ± SD	35.30 ± 3.70	36.95 ± 2.89	36.65 ± 4.72	36.55 ± 4.42
Total number of embryos	34	34	75	156
Number of embryos per cycle (mean ± SD)	1.55 ± 1.63	1.55 ± 1.60	1.56 ± 1.77	2.08 ± 1.95
Number of embryos with PGT-A analysis	20	16	38	74
Euploidy rate (total number and %)	12 (60.00%) ^a	10 (62.5%) ^a	14 (36.84%)	33 (44.59%)

^a Different compared with Group 3 (p < 0.05).

^b Different compared with Group 4 (p < 0.05).

Table 3. Euploid embryos according to women's age, double-strand breaks (DSB) values in semen samples and the semen preparation method (Density gradients or microfluidic sperm sorting (MSS)).

DSB values	Normal (< 60%)		Altered (≥ 60%)
	Density gradient	Density gradient	MSS
Semen preparation method			
Euploidy rate	Euploid embryos (mean ± SD)	Euploid embryos (mean ± SD)	Euploid embryos (mean ± SD)
Women's age			
< 35	3.00 ± 1.00	1.00 ± 0.00 ^{b,c}	4.20 ± 0.84
≥ 35	0.75 ± 0.96 ^a	0.57 ± 0.65 ^c	0.67 ± 1.03 ^a

^a Different compared with cases where women's age is < 35 years from the same column (p < 0.05).

^b Different compared with cases where DSB values are normal (p < 0.05).

^c Different compared with cases where DSB values are altered and using MSS (p < 0.05).

4.3. Proyecto 3

Los resultados finales correspondientes al **Proyecto 3** se han recogido en un artículo publicado en 2021.

- **Título:** *Microfluidic sperm sorting improves ICSI outcomes in patients with increased values of double-strand breaks in sperm DNA.*
- **Autores:** Sandra Lara-Cerrillo; Cristina Urda Muñoz; Moisés de la Casa Heras; Silvia Camacho Fernández-Pacheco; Julio Gijón de la Santa; Tania Lacruz-Ruiz; Candela Rosado-Iglesias; Verónica Gonçalves-Aponte; Vicente Badajoz Liébana y Agustín García-Peiró.
- **Fecha de aceptación:** XXXX de 2021.
- **Referencia y enlace:** XXXXX
- **Revista:** Revista Internacional de Andrología.
- **Factor de impacto (2021):** 1,063.

Además, los resultados de este estudio se han presentado en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

- X congreso nacional bianual de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). 2019. Presentación oral.
- 36º congreso europeo anual de la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE). 2020. Póster.

La versión aceptada para su publicación se muestra a continuación.

Microfluidic sperm sorting improves ICSI outcomes in patients with increased values of double-strand breaks in sperm DNA

Sandra Lara-Cerrillo^{a,b*}, Cristina Urda Muñoz^{c*}, Moisés de la Casa Heras^c, Silvia Camacho Fernández-Pacheco^c, Julio Gijón de la Santa^c, Tania Lacruz-Ruiz^a, Candela Rosado-Iglesias^a, Verónica Gonçalves-Aponte^a, Vicente Badajoz Liébana^c, Agustín García-Peiró^a.

*Authors contributed equally.

^a CIMAB, Barcelona Male Infertility Centre. C/Vallcorba 1-3, Sant Quirze del Vallés (08192 Barcelona) Spain.

^b Departament de Biologia cel·lular, fisiologia i immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). M building, Av/ Can Domènech, Bellaterra (08193 Barcelona) Spain.

^c Clínica GINEFIV de reproducción asistida. C/José Silva 18, Madrid (28043 Madrid) Spain.

Corresponding author:

PhD Agustín García Peiró

CIMAB, Barcelona Male Infertility Centre

C/Vallcorba 1A-3A LOCAL

08192 Sant Quirze del Vallès (Barcelona, Spain)

(+34) 93 858 76 14 | info@cimab.es

Abstract

Background: Delays in embryo kinetics, implantation failures in ICSI treatments and recurrent miscarriages have been associated with high values of Double-Strand Breaks (DSB) in sperm DNA. While conventional methods for semen preparation have been shown to be inefficient reducing DSB values, Microfluidic Sperm Sorting (MSS) devices are promising tools to reduce this damage.

Objective: To study the clinical utility of an MSS device in ICSI treatments when the male partner presents increased DSB values, as compared to the use of conventional methods based on sperm motility.

Methods: This retrospective cohort study included 28 infertile couples undergoing ICSI treatments. Only couples where the male partner presented increased values of DSB were included. DSB values were evaluated in semen samples by the Neutral Comet assay. Couples performed a first ICSI cycle using conventional methods for semen preparation (Density Gradients and Swim-up) and a second ICSI cycle using the ZyMöt™ICSI (formerly named FertileChip®) microfluidic device. Embryology and clinical outcomes were compared between ICSI cycles.

Results: Semen parameters and the number of obtained and fertilized oocytes did not show differences between ICSI rounds. Clinical outcomes were statistically better when MSS was used: the biochemical pregnancy rate increased 28.31%; the clinical pregnancy rate increased 35.56% and the number of live births increased 35.29%, as compared to the first ICSI cycle in this group of patients.

Conclusions: The ZyMöt™ICSI microfluidic device improved the reproductive outcomes in couples where the male partner presented increased DSB values, when compared to the use of conventional semen preparation techniques.

Keywords: Sperm selection; Double-Strand Breaks; Sperm DNA Fragmentation; ICSI; Microfluidic Sperm Sorting.

Introduction

Since the first human pregnancies were achieved through Assisted Reproductive Treatments (ART) in the 1970s, more than eight million babies have been born worldwide thanks to these techniques (1). Different factors are responsible for the significant improvement of ART clinical outcomes, such as the standardization of the procedures and materials in the laboratories or the introduction of the Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) technique in the 1990s (2). All of these improvements lead to a mean pregnancy rate per embryo transfer of 35.0% in Europe and 35.8% in the USA, according to the last available data (3,4).

A male factor is present in half of the infertility cases, meaning that over 30 million men worldwide may experience reproductive difficulties of different aetiologies (5,6). The evaluation of sperm DNA fragmentation has been an emerging field during the last decade, showing that Single- and Double-Strand Breaks (SSB and DSB, respectively) have a major impact on embryos' development and reproductive outcomes (7,8). Increased values of SSB in semen samples have been associated with high levels of Reactive Oxygen Species (ROS) (9). Moreover, ROS have also been shown to negatively affect sperm motility through membrane, axonemal and mitochondrial alterations (10). Since SSB are produced in an extensive manner throughout all of the genome, the presence of this damage may impair first mitotic divisions in embryos (11). In this regard, the presence of SSB in sperm DNA has been associated with lower pregnancy rates in natural conception and a higher risk of preimplantation failures in ART (11,12). On the contrary, DSB are mainly produced in a controlled manner by enzymatic mechanisms (11), for example, through the action of Spo11 during the prophase I stage of spermatogenesis to allow homologous recombination (13). Endonuclease activity, environmental toxics or alterations during histone-protamine replacement can also induce DSB (14). Therefore, first mitotic divisions could be possible in embryos after the injection of sperm with DSB but may lead to lower embryo kinetics during In Vitro Fertilization (IVF) treatments, and to a major risk of pregnancy loss (7,11).

Among different tests to analyse sperm DNA fragmentation, the Comet assay is able to discriminate between SSB and DSB by performing alkaline and neutral versions of the test, respectively (8,15). In this assay, isolated cells are embedded in an agarose microgel and exposed to an electrophoretic current. In the alkaline version of the Comet assay, the double helix of DNA is denaturalized and breaks affecting one DNA strand are visualized (SSB). In neutral

pH conditions, the double helix remains and only breaks affecting both strands are visualized (DSB) (16).

Before the microinjection of sperm during ICSI cycles, semen samples must be processed. Conventional methods for semen preparation include the Swim-up technique (SU), where the sample is centrifuged and the pellet is resuspended in media to allow motile cells to swim to the upper layer of the tube; or Density Gradients (DG), where two layers of colloidal silica at different concentrations filter centrifuged semen samples to obtain motile sperm with normal density (17). These procedures require centrifugation steps which have been widely described to produce iatrogenic DNA damage through ROS formation in patients (18) and fertile donors (19). In this regard, ROS may increase DNA damage, especially in sperm with previously compromised chromatin integrity⁸. Nevertheless, some authors have reported that these conventional methods partially reduce the overall value of SSB in the semen sample because immotile sperm are discarded (20). A recent study showed that the SU procedure and the sperm selection process performed by embryologists during ICSI cycles, based on morphology and motility, significantly reduce SSB values, but did not appear to have any effect in selecting sperm with low DSB damage (21).

New methodologies for sperm selection based on microfluidics have recently emerged (17,22). The microchannels inside these devices imitate the natural sperm selection process that happens inside the female reproductive tract. Interestingly, these Microfluidic Sperm Sorting (MSS) devices do not require centrifugation steps, therefore, avoiding iatrogenic DNA and membrane damage (23). Also about DNA damage, these devices have shown promising results reducing DNA fragmentation values (20,24)

The main objective of the present study is to show the first evidence on the potential beneficial effect on reproductive outcomes of the use of an MSS device in couples with high levels of DSB in semen.

Material and methods

Samples and groups

This retrospective cohort study included two consecutive ICSI cycles from 28 infertile couples. A first ICSI cycle was performed using DG and SU for semen preparation. After the failure of this cycle, males were assessed for DSB values by the Neutral Comet assay, showing altered values

(>60%, internal cut-off value). A second ICSI cycle was programmed using an MSS device with the objective of reducing DSB values. No lifestyle changes were recorded between either ICSI cycles, including nutritional or toxic consumption, for both the female and the male partners. Couples were excluded from the study when the male presented normal values of DSB (<60%) or other fertility impairments such as genitourinary infections or severe alterations of the sperm parameters (25); or when the female presented other infertility conditions, aside from advanced age, such as hormonal disturbances, endometriosis, polycystic ovary or tubal factor. ICSI treatments were performed at the Ginefiv reproductive centre. This study was approved by the Corporació Sanitària Parc Taulí Ethics Committee (Ref.: Ref.: 2017902) and signed informed consents were obtained from all patients.

Ovarian stimulation and oocyte retrieval

Ovarian stimulation was carried out using a short protocol with Gonadotropin releasing hormone (GnRH) antagonists: FSHr (Gonal; MerckSerono, Germany), HMG (Menopur; Meriofert, Italy), FSHr and LHR (Pergoveris; MerckSerono, Germany). Ovulation was induced when three or more follicles reached 17mm in diameter using GnRH analogues (Decapeptyl 0.2mg; Ipsen Pharma, France) and hCG (Ovitrelle; MerckSerono, Germany). Oocyte retrieval was performed 34-36 hours later.

Women received oestrogens to prepare the endometrium through oral administration of Progynova (Bayer, Germany) or Meriestra (Novartis, Switzerland) (4-8mg/day). After oocyte retrieval, women started the administration of progesterone (Progeffik; Effik, Spain or Utrogestan; Seid, Spain). If a pregnancy was confirmed, the administration of oestrogens and progesterone was maintained up to a maximum of 100 days.

Oocytes were maintained in G-IVF media (Vitrolife, Sweden) and denuded using 1:9 hyaluronidase (Hyasetm-10x; Vitrolife, Sweden) and buffered media (G-MOPS Plus; Vitrolife, Sweden).

Sperm selection and ICSI

Semen samples were obtained by masturbation after 3-5 days of sexual abstinence. Semen parameters were evaluated before each ICSI treatment. Sperm DNA damage was evaluated between both cycles.

During the first ICSI treatment, semen preparation was performed using a combination of DG and SU. Gradients were prepared using 80% and 40% Sperm Grad and IVF media (Vitrolife, Sweden). The first centrifugation was performed at 1000rpm during 20 minutes. The pellet was resuspended in 0.7mL of IVF media. A final washing step was performed during 5 minutes at 1200rpm. The pellet was resuspended in 150-300µL of IVF media and a standard SU procedure was performed²⁵.

During the second ICSI treatment, semen preparation was performed using an MSS device (ZyMöt™ICSI, formerly named FertileChip®; DxNow Inc., MD, USA). The five channels were hydrated by injecting 13µL of IVF media. Then, 1µL of the raw semen sample was slowly injected through the inlet port. The MSS was incubated for 30 minutes at 37°C in a CO₂ atmosphere. After incubation, selected sperm were recovered from the outlet port.

Spermatozoa were microselected in a polyvinylpyrrolidone and recombinant human albumin microdrop (Vitrolife, Sweden) following the recommendations of the World Health Organization for normal morphology and progressive motility (25). Microinjection of oocytes was performed by the same embryologist using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE200S 40x; Japan) on a heated surface at 37°C (Tokai Hit Termo Plate; Olympus; Japan). Microinjected oocytes were cultured in G-TL™v5 PLUS media microdrops (Vitrolife, Sweden) and incubated in a low concentration of oxygen conditions (K-System; Origio, Denmark or Embrycope; Vitrolife, Sweden).

Fertilization, embryo development and transfers

Embryos were evaluated after 18-20h post-insemination. Fertilization was recorded when two pronuclei and two polar bodies were observed. Embryos were evaluated and morphologically classified according to the Spanish guidelines as A/B/C/D-grade (26). Embryo transfers were performed using ultrasound-guidance. Only clinical results from fresh transfers are shown.

Clinical outcomes

The occurrence of a biochemical pregnancy was evaluated 14 days after the embryo transfer through the detection of β-human chorionic gonadotropin (βHCG) in peripheral blood. Clinical pregnancy was evaluated by abdominal ultrasound to detect a gestational sac and foetal heart rate. Miscarriage was diagnosed when no foetal heart rate was detected after determining a clinical pregnancy.

Sperm DNA fragmentation assessment

The Neutral Comet assay was performed under specifically designed conditions to allow the detection of DSB (11). Briefly, sperm samples were washed twice in PBS 1x, mixed 1:2 (v/v) with 1% low-melting-point agarose (Sigma-Aldrich, USA), fixed on a slide, jellified at 4°C and immersed in two consecutive lysis solutions. Electrophoresis was performed at 20V for 12.5 minutes in TBE buffer (pH 8.5). Slides were washed in a 0.4M Trizma Base neutralization solution (pH 7.5), dehydrated in ethanol series and horizontally dried. Samples were stained with DAPI (Diamond Antifade Mountant; Invitrogen, OR, USA) and 200 cells were classified as normal or fragmented attending to the criteria reported before (27) (Figure 1).

Statistics

Normality was studied through the Shapiro-Wilk test. The Kruskal-Wallis test was performed to find differences between groups. The Fisher's Exact test was performed for general comparisons between groups. All tests were considered significant with a confidence interval of 95%.

Results

Men's and women's ages

Two consecutive ICSI cycles from 28 infertile couples were analysed. The mean ages of men and women at the first ICSI cycle were 37.53 ± 3.28 years and 35.67 ± 3.43 years, respectively. After a few months, couples started a second ICSI cycle, when men presented a mean of 38.33 ± 3.33 years and women a mean of 36.47 ± 3.57 years, respectively (Table 1). These ages were not statistically different ($p=0.143$ and $p=0.143$, respectively).

Seminal parameters and DSB values

All semen samples were assessed for concentration, morphology and progressive motility before each ICSI cycle (Table 1). No statistically significant differences were found between ICSI cycles ($p=0.270$; $p=0.900$ and $p=0.900$, respectively). Males showed a mean value of DSB of $71.18\% \pm 9.88\%$ between the first and the second ICSI rounds (>60% in all cases).

Oocyte retrieval and fertilization

After ovarian stimulation, similar numbers of oocytes were obtained during both ICSI rounds ($p=0.336$). Also, similar numbers of oocytes could be finally microinjected ($p=0.152$). After 18-

20h post-insemination, a similar number of oocytes was fertilized ($p=0.365$). Fertilization rates did not show statistical differences ($p=0.870$) (Table 1).

Embryo quality

Blastocyst morphology was analysed and embryos were classified as A/B/C/D-grade. No significant differences were detected between ICSI rounds for each grade ($p=0.097$; $p=0.445$; $p=0.429$ and $p=0.134$, respectively). However, an increase of 46.0% in the A-grade blastocysts was observed when the MSS device was used (Table 1).

Clinical outcomes

A similar number of couples obtained good-quality embryos and performed a transference after using conventional methods or the MSS device for semen preparation ($p=0.786$) (Table 2). Clinical outcomes, including biochemical pregnancy rates, clinical pregnancy rates, the number of live births and the number of miscarriages, are shown in Table 2. Results show a statistically significant increase of 28.31% in the biochemical pregnancy rate ($p=0.041$) and an increase of 35.56% in the clinical pregnancy rate ($p=0.070$) when the MSS device was used for semen preparation, as compared to the use of conventional methods.

Regarding live births, results show a statistically significant increase of 35.29% when the ZyMöt™ICSI device was used. A total of six live births were obtained in the second ICSI round, while no live births resulted in the same couples using conventional methods ($p=0.039$).

When couples used conventional methods for semen preparation, two pregnancies were achieved but ended up in miscarriages during the first trimester. On the contrary, eight pregnancies were achieved using an MSS device. From that, only two ended up in miscarriages. Results show a statistically significant reduction of 75% in the miscarriage rate ($p<0.010$).

Discussion

The presence of high values of DSB in sperm DNA have been associated with delays in embryo kinetics and recurrent pregnancy loss (7,11). There is no evidence that conventional semen preparation techniques reduce DSB (21), but the ZyMöt™ICSI microfluidic device is a promising tool to reduce this damage (20,24). In this sense, the main objective of this retrospective cohort study was to provide the first evidence on the clinical utility of this microfluidic device for semen

preparation, as compared to the use of conventional methods, when patients present high values of DSB in the semen sample.

The ICSI procedure was originally conceived to treat the severe male factor (2). Due to its reasonably easy standardization and the possibility to control laboratory timings, the use of this technique increased to 71.3% of fresh ART cycles worldwide (28). However, ICSI outcomes are not as optimal as one could imagine (1). Some authors suggest that these rates are limited due to the bypass of the natural sperm selection process that happens through the female genital tract and during natural fertilization (29). Although it is not fully understood, this natural selection process may select spermatozoa with higher genetic integrity to reach the oocyte (30).

In order to select the best spermatozoon to fertilize the oocyte, conventional semen preparation techniques aim to discard dead or immotile cells (17). After that, embryologists select spermatozoa with optimal morphology and motility for microinjection in ICSI cycles (30). It has been described that ROS may cause both poor motility and SSB (9,10). Therefore, those semen preparation techniques based on sperm motility could reduce the risk of selecting spermatozoa with high values of SSB. On the contrary, sperm motility and DSB have different origins and do not appear to be associated. This may explain, at least in part, why the use of conventional selection techniques, such as the SU, combined with ICSI sperm selection, does not appear to select spermatozoa with low values of DSB (21). Moreover, multiple studies have shown that apparently normal selected sperm may present morphologic alterations, such as vacuoles (31), and high rates of sperm DNA damage when observed under high magnification (32). Consequently, altered sperm with an apparently normal morphology could be finally injected into the oocyte. In this regard, Ramos et al. described in 2004 that only 55% of sperm injected in ICSI cycles contain intact DNA. In these cases, genetic, epigenetic or chromatin alterations could be transmitted to the embryo, resulting in implantation failures, miscarriages and, more importantly, could lead to a liveborn with genetic alterations. In this regard, the ICSI procedure has been related to higher rates of chromosomal and epigenetic abnormalities, intellectual disabilities or autism, when compared to natural conception (34).

In the present study, high DSB values were detected in 28 males from infertile couples undergoing ICSI treatments. A first cycle using conventional methods (a combination of DG and SU) obtained poor results, even though women were not of evident advanced age (mean age of 35.67 years) (Table 1). From the 28 couples, only 16 obtained good-quality embryos to be

transferred. On the contrary, 12 couples did not obtain any transferable embryo. In these cases, the presence of a high rate of sperm DNA damage could be compromising embryo's development (7). Other factors, such as maternal age, oocyte quality after ovarian stimulation or the activation of oocytes could also be related to the lack of transferable embryos in these cases³⁵. After embryo transfer, patients presenting altered DSB values obtained a significantly lower pregnancy rate (12.5%), as compared to the average pregnancy rates reported in IVF clinics from Europe (35.0%) and the USA (35.8%) (3,4). This result highlights the critical role of sperm DNA integrity, especially DSB, to obtain healthy embryos that conclude in successful pregnancies (7).

In order to specifically reduce DSB values, the use of the ZyMöt™ICSI microfluidic device offer different advantages: it is a cost-effective and standardized methodology able to filter small volumes of semen; it avoids iatrogenic DNA and membrane damage produced by the rise of ROS during sperm centrifugation (18,19); it reduces sample manipulation (17); the microfluidic technology inside the channels somehow imitates the natural selection process that takes place throughout the female genital tract (17) and, also, it has been also shown to reduce by almost 50% of DSB values in a semen sample (Figure 1) (20,24).

To evaluate the potential beneficial effect of the ZyMöt™ICSI microfluidic device, the same group of patients underwent a second ICSI cycle using this technology for semen preparation.

The mean age of patients and semen parameters of males were not statistically different between the first and the second ICSI treatment (Table 1). Also, the number of oocytes obtained after ovarian stimulation, the number of oocytes microinjected and the number of embryos obtained did not show statistical differences (Table 1). Therefore, ICSI rounds were considered to be compared. It was previously shown that high SSB values in semen samples could impair fertilization (11). A recent study showed that conventional methods for semen preparation such as the SU procedure, and the sperm selection performed by embryologists during ICSI cycles attending to sperm motility, entail a major reduction of SSB values (21). Consistently, the fertilization rates obtained in this study when conventional methods and the MSS device were used for semen preparation did not show statistical differences (Table 1). As motile sperm were selected, SSB damage might have been avoided during both ICSI treatments (21).

The presence of high values of DSB in a semen sample has been related to a delay in embryo kinetics (7) and a major risk of pregnancy loss (11). As mentioned before, while conventional

methods and the ICSI sperm selection process were not shown to reduce DSB values (21), the ZyMöt™ICSI is a promising tool to reduce this damage (24). Consistently, results show that the use of the MSS device in the second ICSI cycle from these couples resulted in a major proportion of A-grade embryos with normal morphokinetics (Table 1). During the second ICSI cycle, 17 couples obtained transferable embryos, while 11 did not (Table 2). As in the first ICSI cycle, other maternal or paternal factors could be affecting these couples (35). Further studies analysing a larger cohort of patients could help in confirming this increase in A-grade embryos.

Among couples who performed a transfer, results show better clinical outcomes during the second ICSI treatment, as compared to the first one (Table 2). Also, about 28% more couples achieved a biochemical pregnancy in the second ICSI cycle, when compared to the previous cycle. About 36% more couples achieved a clinical pregnancy detecting the gestational sac and foetal heart rate. Moreover, about 35% more live births were recorded after the use of the MSS device. These results suggest that using the ZyMöt™ICSI microfluidic device to reduce high DSB values in the semen sample avoids the detrimental effect of this damage in embryos, which leads to better clinical outcomes (Table 2).

Concerning miscarriages, from two pregnancies obtained in the first ICSI cycle, both ended up in a miscarriage. Only two out of eight pregnancies were loss in the second ICSI cycle (Table 2). In agreement with previous results, the reduction of DSB resulted in lower miscarriage rates (11). As described before, the repair of DSB in the embryo is error-prone because there is not a complementary chain to assure the integrity of the sequence (35,36). In this sense, the repair of two non-consecutive DSB can lead to structural alterations such as inversions or translocations that could not be tolerated by the embryo leading to a pregnancy loss. Moreover, the DSB can affect a critical gene or a regulatory sequence³⁶. This observation has been named the “late paternal effect” by some authors⁸.

In order to prevent miscarriages, the Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy (PGT-A) evaluates the euploidy of the obtained embryos and allows the discarding of those with chromosomal alterations (37). However, this procedure in itself does not allow couples to obtain more euploid embryos during an ICSI cycle. Chromosomal alterations, such as translocations, could be related to the presence of DSB in the paternal genome (36). Therefore, the specific reduction of this damage using MSS could lead to the obtaining of more euploid embryos and, therefore, to a higher pregnancy rate and higher cumulative live birth rate. Although it is still

under discussion, this could be related to the increase in the proportion of A-grade embryos which showed a good morphokinetic development in this study (38). These embryos could not carry chromosomal alterations derived from paternal DSB which would allow a proper cell-division rate (7).

Interestingly, the pregnancy rate obtained in this study using the MSS device (47.06%) was higher than the average rates observed in Europe (35.0%) and the USA (35.8%) (3,4). Considering that general rates include heterogeneous infertility cases, the comparison between both ICSI rounds indicate that the specific detection of DSB using the Neutral Comet assay and its specific reduction using the ZyMöt™ICSI MSS device significantly improve ICSI pregnancy rates, as compared to use of conventional methods (12.5%). This increase reaches values above worldwide mean rates (Table 2).

As far as we are concerned, this is the first study analysing the potential benefit of using MSS technologies for semen preparation in ICSI cycles, specifically addressed to reduce DSB values in the semen sample. In order to avoid interferences from unknown female or male factors affecting fertility, the same couples were studied using conventional methods and the ZyMöt™ICSI device in two consecutive ICSI cycles performed by the same laboratory and embryologists. Future studies including a larger number of ICSI cycles should help to confirm these results. One limitation of this study is the impossibility to assess the clinical result of all obtained embryos from A- to D-grades. Results are based on transferable A/B-grade embryos and also, when a pregnancy and a live birth were obtained, the other possible good-quality embryos from the couple were not transferred. If this MSS device could be adapted, animal models could be used to perform an extensive comparison between sperm selection methods to understand the global effect of sperm DNA damage, especially DSB, in embryo's development and pregnancy outcomes.

Conclusions

The detection of DSB damage in infertile males has been shown to be effective in the identification of those patients that can benefit from the use of the ZyMöt™ICSI device. This MSS methodology shows a statistically significant improvement in clinical outcomes, when compared to conventional sperm selection techniques (DG and SU) in patients with high DSB values.

Conflict of interest

PhD Agustín García-Peiró have commercial interest in the ZyMöt™ICSI microfluidic sperm sorting device and the Comet Assay for sperm DNA fragmentation testing. None of the other authors have a conflict of interest to declare.

Funding

This project has been financed by the CIMAB and the Ginefiv centres and supported by an Industrial Doctorate grant (Doctorados Industriales) given by the Economy, Industry and Competitiveness Ministry of Spain (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad) and the State Investigation Agency (Agencia Estatal de Investigación) (Ref.: DI-16-08429).

References

1. Esteves SC, Humaidan P, Roque M, Agarwal A. Female infertility and assisted reproductive technology. *Panminerva Med.* 2019;61(1):1-2.
2. Palermo GD, Cohen J, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: A powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil Steril.* 1996;65(5):899-908.
3. Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2012: Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2016;31(8):1638-1652.
4. US Dept of Health and Human Services. Assisted Reproductive Technology Manual - Fertility Clinic Success Rates Report 2017.; 2019.
5. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13(1):37.
6. Gumus E, Kati B, Pelit ES, Ordek E, Ciftci H. A different look at genetic factors in individuals with non-obstructive azoospermia or oligospermia in our research study: To whom, which threshold, when, in what way? *Rev Int Androl.* 2021;19(1):41-48.
7. Casanovas A, Ribas-Maynou J, Lara-Cerrillo S, et al. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertil Steril.* 2019;111(4):699-707.e1.
8. Agarwal A, Barbăroşie C, Ambar R, Finelli R. The impact of single- and double-strand DNA breaks in human spermatozoa on assisted reproduction. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):1-14.

9. 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(6):684-703.
10. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health*. 2014;32(1):1.
11. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernandez-Encinas A, et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One*. 2012;7(9).
12. Simon L, Proutski I, Stevenson M, et al. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(1):68-78.
13. Lange J, Pan J, Cole F, Thelen MP, Jasin M, Keeney S. ATM controls meiotic double-strand break formation. *Nature*. 2012;479(7372):237-240.
14. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2006;12(4):417-435.
15. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*. 2013;1(5):715-722.
16. Singh NP. The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2016;767:23-30.
17. Marzano G, Chiriaco MS, Primiceri E, et al. Sperm selection in assisted reproduction: A review of established methods and cutting-edge possibilities. *Biotechnol Adv*. 2020;40(December 2019):107498.
18. Balaban B, Sakkas D, Gardner DK. Laboratory procedures for human in vitro fertilization. *Semin Reprod Med*. 2014;32(4):272-282.
19. Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Gouraud A, Holt W V. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev*. 2011;78(12):951-961.
20. Quinn MM, Jalalian L, Ribeiro S, et al. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum Reprod*. 2018;33(8):1388-1393.
21. Lara-Cerrillo S, Ribas-Maynou J, Rosado-Iglesias C, Lacruz-Ruiz T, Benet J, García-Peiró A. Sperm selection during ICSI treatments reduces single- but not double-strand DNA break values compared to the semen sample. *J Assist Reprod Genet*. 2021;38(5):1187-1196.
22. Samuel R, Feng H, Jafek A, Despain D, Jenkins T, Gale B. Microfluidic-based sperm sorting & analysis for treatment of male infertility. *Transl Androl Urol*. 2018;7(1):S336-S347.

23. Göde F, Gürbüz AS, Tamer B, Pala I, Isik AZ. The effects of microfluidic sperm sorting, density gradient and swim-up methods on semen oxidation reduction potential. *Urol J*. 2020;17(4):397-401.
24. Pujol Masana A, García-Peiró A, Ribas-Maynou J, Lafuente R, Mataró D, Vassena R. A microfluidic sperm sorting device reduces the proportion of sperm with double strand DNA fragmentation. *Zygote*. 2021;(in press).
25. WHO. WHO Laboratory Manual for the examination and precessing of human semen. World Heal Organ Press. 2010;5th Ed.
26. ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica: criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. *Cuad Embriol clínica ASEBIR*. 2015:9-20.
27. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod*. 2012;27(3):652-658.
28. De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, et al. ART in Europe, 2014: Results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod*. 2018;33(9):1586-1601.
29. Xiong X, Dickey RP, Buekens P, Shaffer JG, Pridjian G. Use of Intracytoplasmic Sperm Injection and Birth Outcomes in Women Conceiving through In Vitro Fertilization. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2017;31(2):108-115.
30. Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CLR. Sperm selection in natural conception: What can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Hum Reprod Update*. 2015;21(6):711-726.
31. Perdrix A, Rives N. Motile sperm organelle morphology examination (MSOME) and sperm head vacuoles: State of the art in 2013. *Hum Reprod Update*. 2013;19(5):527-541.
32. Pastuszek E, Kiewisz J, Skowronska P, et al. An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human spermatozoa on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay. *Andrology*. 2017;5(2):392-398.
33. Ramos L, De Boer P, Meuleman EJH, Braat DDM, Wetzels AMM. Evaluation of ICSI-Selected Epididymal Sperm Samples of Obstructive Azoospermic Males by the CKIA System. *J Androl*. 2004;25(3):406-411.
34. Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, et al. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Engl J Med*. 2012;366(19):1803-1813.
35. Hartshorne GM. Factors controlling embryo viability. *Hum Fertil*. 2001;4(4):225-234.

36. Middelkamp S, van Tol HTA, Spierings DCJ, et al. Sperm DNA damage causes genomic instability in early embryonic development. *bioRxiv*. 2019;(April):1-12.
37. Griffin DK, Ogur C. Chromosomal analysis in IVF: Just how useful is it? *Reproduction*. 2018;156(1):F29-F50.
38. Pennetta F, Lagalla C, Borini A. Embryo morphokinetic characteristics and euploidy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2018;30(3):185-196.

Tables and figures

Table 4. Number of ICSI cycles performed, semen parameters, men and women's age and embryology results using conventional methods (DG+SU) or the MSS device (ZyMötICSI) for semen preparation. All male patients presented altered DSB values (>60%).

ICSI cycle	First		Second	
	DG+SU		ZyMötICSI	
Sperm selection method	Number	Mean ± SD	Number	Mean ± SD
Number of ICSI cycles	28		28	
Semen parameters:				
Concentration ($\cdot 10^6$ /mL)		35.28 ± 20.23		34.02 ± 21.77
Normal morphology (%)		2.78 ± 1.02		2.73 ± 1.45
Progressive motility (%)		38.21 ± 8.82		38.08 ± 7.64
Men's age		37.53 ± 3.28		38.33 ± 3.33
Women's age		35.67 ± 3.43		36.47 ± 3.57
Obtained oocytes	324	11.57 ± 4.30	311	11.11 ± 7.67
Inseminated oocytes	258	9.21 ± 4.31	220	7.86 ± 4.83
Fertilized oocytes (2PN)	136	4.86 ± 3.27	127	4.54 ± 4.34
Fertilization rate		0.51 ± 0.29		0.50 ± 0.27
Blastocysts:	56	2.00 ± 1.56	62	2.21 ± 2.28
A grade	7	0.25 ± 0.44	20	0.71 ± 1.44
B grade	18	0.64 ± 0.87	13	0.46 ± 0.79
C grade	30	1.07 ± 1.05	23	0.82 ± 1.39
D grade	1	0.04 ± 0.19	6	0.21 ± 0.57

DG+SU: sperm selection combining Density Gradients and Swim-up procedures.
PN: pronuclei.

Table 5. ICSI clinical outcomes including the biochemical pregnancy rate, the clinical pregnancy rate, the number of live births and miscarriages when using conventional methods (DG+SU) or the MSS device (ZyMötICSI) for semen preparation. All male patients presented altered DSB values (>60%).

ICSI cycle	First		Second	
	DG+SU		ZyMötICSI	
Sperm selection method	Number	%	Number	%
ICSI cycles with embryo transfer	16	57.14	17	60.71
Biochemical pregnancies (per transfer)	3	18.75	8*	47.06*
Clinical pregnancies (per transfer)	2	12.50	8	47.06
Live births (per transfer)	0	0.00	6*	35.29*
Miscarriages (per clinical pregnancy)	2	100.00	2*	25.00*

DG+SU: sperm selection combining Density Gradients and Swim-up procedures.

*Statistical differences compared to the first ICSI cycle ($p < 0.05$)

5. DISCUSIÓN

El factor masculino ha mostrado una contribución significativa en los casos de infertilidad (18) (Figura 7). Pese a haber disponibles diversos biomarcadores de infertilidad, la realidad es que la evaluación del varón en una pareja infértil se suele basar solamente en la medición de los parámetros seminales. Esta evaluación se suele ampliar cuando han ocurrido fallos repetidos en reproducción asistida (18). Como han mostrado diversos estudios, y respaldado por la propia OMS, los valores de seminograma son fluctuantes y no permiten explicar todos los casos de infertilidad (103). Así pues, la incorporación de más biomarcadores a la rutina de diagnóstico sería de gran interés, sobre todo para encontrar la posible raíz de la infertilidad en casos idiopáticos o tras fallos en ciclos previos de reproducción asistida.

Entre los biomarcadores de fertilidad masculina más estudiados encontramos la **fragmentación del ADN espermático** (104). Este parámetro se presenta en valores elevados en pacientes infértiles con astenozoospermia, que no consiguen un embarazo de forma natural, que sufren abortos o que han tenido fallos de reproducción asistida (90,92,96,98,99). La última guía publicada por parte de una organización especializada en este ámbito fue en 2013 por parte de la asociación americana ASRM. Pese a los múltiples estudios que describen la relación entre los niveles de fragmentación y la infertilidad masculina, en esta guía se concluyó que la evaluación de la fragmentación no debería realizarse de forma rutinaria en pacientes infértiles. Esta conclusión se basó en que los estudios publicados hasta esa fecha no mostraban una relación suficientemente fuerte entre los valores de fragmentación y los resultados reproductivos de las parejas que realizan TRA (87). No obstante, en el último manual de la OMS sobre el procesamiento y examen de muestras seminales publicado este año 2021 sí se ha incluido el análisis de la fragmentación en el apartado de “examen extendido” (107). En este apartado se describen procedimientos diagnósticos que pueden ser de utilidad en algunos casos pero que

requieren una indicación concreta. Además, cabe tener en cuenta que en este apartado se incluyen procedimientos no estandarizados que pueden variar según el laboratorio.

El objetivo de la presente tesis doctoral ha sido encontrar una respuesta a esta falta de consenso sobre la utilidad de la evaluación de la fragmentación del ADN espermático para predecir el resultado de un tratamiento de ICSI. La hipótesis planteada es que podría existir un **sesgo diagnóstico** entre los valores de fragmentación medidos en el eyaculado y la subpoblación de espermatozoides utilizados en reproducción asistida. Para encontrar este posible sesgo, se ha realizado un estudio multimetodológico de la fragmentación que permite la distinción entre las roturas **SSB y DSB**. Una vez evaluado este sesgo diagnóstico, se ha estudiado el **efecto clínico** de la reducción de los niveles de SSB y DSB en ciclos de ICSI así como un posible tratamiento para reducir estos valores mediante un método de selección espermática basado en microfluídicos.

A continuación, se presenta una discusión secuencial de los resultados obtenidos en los proyectos presentados.

5.1. Las técnicas de análisis de la fragmentación del ADN espermático pueden adaptarse para el estudio de espermatozoides microseleccionados

Los **protocolos convencionales** de las técnicas de análisis de la fragmentación del ADN espermático están diseñados para el estudio de cientos de espermatozoides en la muestra seminal. Durante la consecución del Proyecto 1 ha sido necesario adaptar estos protocolos para poder estudiar un número bajo de espermatozoides tras su selección simulando el proceso de un ciclo de ICSI.

La **adaptación de las técnicas** se ha realizado en el **Proyecto 1.1** atendiendo al tipo de fijación de los espermatozoides requerido en cada una: i) en una matriz de agarosa para las técnicas

Comet neutro, Comet alcalino y SCD y ii) una fijación sobre el portaobjetos tras un tratamiento con solución de Carnoy para la técnica TUNEL.

La mejor combinación de condiciones para la fijación en una **matriz de agarosa** incluye la homogeneización de la gota de inyección y del medio donde se contienen los espermatozoides. Tras la aplicación de una leve vibración se consigue que ambos medios se mezclen obteniendo la concentración de agarosa adecuada para que luego se produzca una correcta dispersión de los halos de cromatina y la migración de fragmentos de ADN. Si no se consigue una homogeneización correcta, la concentración de agarosa alrededor del núcleo espermático no es la adecuada, alterando la formación del halo y la migración de los fragmentos de ADN (Tabla 4).

Estos protocolos adaptados se aplicaron en el Proyecto 1.2 sobre un total de 3.217 espermatozoides ICSI-S y resultó en buenas **eficiencias de recuperación** (97,0%) y **de análisis** (84,5%). No obstante, un 3% de los espermatozoides aspirados en la placa de ICSI no se llegaron a inyectar en las gotas de fijación. Durante los ciclos de ICSI solamente un espermatozoide debe ser aspirado, guardado dentro de la micropipeta e inyectado en el ovocito cada vez. Para ello, las micropipetas están diseñadas con unas dimensiones y volúmenes internos específicos. En cambio, por requerimientos experimentales, en los procedimientos adaptados se aspiran grupos de 10-20 espermatozoides seleccionados pudiendo sobrepasar el codo de la micropipeta. A partir de este punto, el diámetro interno aumenta y algunos espermatozoides pueden quedarse en este espacio y no ser inyectados. La aspiración de menos espermatozoides podría reducir esta pérdida. No obstante, en estos experimentos se asumió la pérdida de un 3% de los espermatozoides para poder evaluar un número mayor de células totales en grupos de 10-20 espermatozoides.

Tras la fijación en una matriz de agarosa se observó que los espermatozoides podían no ser evaluados debido a dos motivos distintos: i) por una dispersión irregular de la cromatina

relacionada con una mala homogeneización entre la agarosa y el medio de inyección o ii) por una dispersión incompleta de la cromatina relacionada con el cambio de posición de los espermatozoides a la periferia del gel donde la agarosa se endurece más (conocido como el “efecto del borde”) (129). De nuevo, se testaron diferentes combinaciones de volumen de gota de agarosa, tiempo de homogeneización, número de espermatozoides inyectados para minimizar estos artefactos. La combinación que permitió menos pérdida de eficiencia de análisis es la descrita en el apartado de “Material y métodos”, resultando en un 85% de espermatozoides analizados, frente a una pérdida del 15%.

En cuanto a la fijación con **solución de Carnoy**, fue necesario inyectar los espermatozoides en una gota de agua miliQ ya que el medio de cultivo resultaba en un residuo sólido al secarse. El tratamiento previo con el fijador gota a gota ha permitido que la eficiencia de análisis fuera del 100% ya que ningún espermatozoide fijado presentó impedimentos para poder ser evaluado por la técnica TUNEL. Sin este tratamiento previo algunos espermatozoides inyectados se desprendían y no quedaban fijados.

5.2. La evaluación de la fragmentación en el eyaculado no es representativa de los espermatozoides seleccionados en ciclos de ICSI

Con el objetivo de dar una explicación a la falta de consenso sobre la relación existente entre los valores de fragmentación y los resultados reproductivos, en esta Tesis Doctoral se ha evaluado la posible existencia de un **sesgo diagnóstico**. En el **Proyecto 1.2** se planteó la posibilidad de que el análisis de la fragmentación, que se realiza sobre el eyaculado, no sea representativo de los pocos espermatozoides que cumplen los criterios para ser microseleccionados e inyectados en ciclos de ICSI (ICSI-S). Como paso intermedio, se evaluó también la fragmentación en muestras

tras realizar un Swim-up. Los resultados muestran una clara distinción entre las roturas SSB y DSB al comparar las muestras de **eyaculado**, tras realizar un **Swim-up** y los **ICSI-S**.

En cuanto a fragmentación del tipo **SSB**, se ha observado una disminución significativa de los valores en la muestra de Swim-up en comparación con el eyaculado. También se ha observado una disminución aún mayor de los niveles de SSB en los ICSI-S en comparación con las muestras anteriores. Estos resultados se han obtenido de forma equivalente tras aplicar tres técnicas distintas (Comet alcalino, SCD y TUNEL) (Figura 2a en el artículo correspondiente al Proyecto 1.2).

La disminución en los valores de SSB podría estar relacionada con el origen de este tipo de daño: el **estrés oxidativo**. Una concentración elevada de ROS induce roturas del tipo SSB, pero también genera una disminución de la motilidad de los espermatozoides (67,130). El hecho de que en el eyaculado se observen los mayores niveles de SSB podría deberse a que en esta muestra se encuentran espermatozoides con diferentes patrones de movilidad (desde móviles progresivos a inmóviles). Todos aquellos espermatozoides que no presenten una óptima movilidad progresiva podrían contener SSB en su ADN. En cambio, en la muestra de Swim-up se disminuye la proporción de espermatozoides inmóviles, con lo que también es coherente que se haya reducido la proporción de espermatozoides con SSB. Siguiendo el mismo razonamiento, la selección manual de espermatozoides con motilidad óptima por parte del personal de embriología durante un ciclo de ICSI ha resultado en niveles muy bajos de SSB.

Como se había observado en publicaciones anteriores, los pacientes que no consiguieron un embarazo de forma natural o que presentaron fallos de implantación en ciclos anteriores mostraron niveles elevados de SSB (94,131) (Figura 2b en el artículo correspondiente al Proyecto 1.2). Los resultados obtenidos sugieren que estos pacientes podrían obtener buenos resultados

si se aplica un tratamiento de ICSI. Este procedimiento podría evitar el daño del tipo SSB durante la preparación de la muestra y durante la selección de los espermatozoides para fecundar.

En cuanto a la fragmentación del tipo **DSB**, no se ha observado una disminución de estos valores entre las muestras de eyaculado, Swim-up e ICSI-S (Figura 2a en el artículo correspondiente al Proyecto 1.2). Pese a que se seleccionan espermatozoides móviles, estos pueden contener roturas del tipo DSB ya que no existe una relación entre ambos parámetros (96). Estos resultados son coherentes con una publicación reciente de Casanovas y col. (93). En ese estudio se observó que el uso de espermatozoides de una muestra seminal de ratón con elevados valores de DSB tenía efectos negativos en la cinética embrionaria tras realizar ciclos de ICSI. Por el contrario, cuando los espermatozoides provenían de una muestra con niveles elevados de SSB no se observaba ningún efecto en el desarrollo embrionario ya que este daño se evitaría durante la selección espermática (93).

Coincidiendo con los resultados de Ribas-Maynou y col., en pacientes con historial de abortos de repetición se observaron niveles elevados de DSB (97). Los resultados de este proyecto sugieren que, al no evitarse este daño durante los ciclos de ICSI, un paciente con niveles elevados de DSB en su eyaculado no podría evitar su efecto perjudicial en el desarrollo embrionario al realizar un ciclo de ICSI y podría mantener un elevado riesgo de aborto.

Así pues, se ha encontrado un **sesgo diagnóstico** en la evaluación de la fragmentación del ADN espermático: los valores de fragmentación diagnosticados en el eyaculado no son representativos de los valores presentes en ICSI-S en cuanto a roturas del tipo SSB (ya que se reduce significativamente este daño durante el proceso de selección), pero sí son representativos de los valores de DSB (ya que estos valores no se reducen durante la selección y pueden transmitirse al embrión).

En vista de este sesgo, se pone de manifiesto que para asegurar una correcta interpretación de la integridad genética de los espermatozoides finalmente usados en el ciclo de ICSI, es de gran importancia la aplicación de técnicas que permitan distinguir entre los dos tipos de fragmentación. En este estudio la mejor técnica fue el test Comet en sus versiones alcalina y neutra (Figuras 16 y 17). Los niveles de SSB se pudieron detectar con otras técnicas como el SCD y el TUNEL, aunque con menor sensibilidad. Por el contrario, solo el Comet neutro pudo detectar roturas del tipo DSB, que quedan subestimadas con las demás técnicas. Estos resultados corroboran los datos presentados en el estudio de Ribas-Maynou y col. donde se comparó la sensibilidad y especificidad de estas técnicas para analizar SSB y DSB (99).

La falta de detección de los dos tipos de roturas por separado, junto con el sesgo diagnóstico en los niveles de SSB, podrían ser responsables, al menos en parte, de la falta de asociación entre los resultados de fragmentación en el eyaculado y los resultados reproductivos en ciclos de ICSI que se propuso en la revisión de la asociación ASRM en 2013 (87).

5.3. Los espermatozoides con morfología o movilidad alteradas presentan valores incrementados de SSB y DSB

Tras el estudio de los espermatozoides candidatos a ser seleccionados en ciclos de ICSI (ICSI-S), se caracterizó el perfil de fragmentación en el ADN espermático de espermatozoides que serían descartados (**ICSI-N**) por tener una alteración en su morfología o en su movilidad en el **Proyecto 1.3**. Se han estudiado tres grupos de ICSI-N: i) con alteraciones en la cabeza, pero móviles; ii) con alteraciones en la pieza intermedia, pero móviles y iii) con morfología normal, pero inmóviles.

Los resultados muestran un aumento significativo de los valores de **SSB** en los tres tipos de espermatozoides ICSI-N respecto a las muestras de eyaculado, Swim-up y los espermatozoides

ICSI-S (Tabla 6 y Figura 22). En especial, el subgrupo de **espermatozoides inmóviles** mostró los valores de SSB más elevados, observándose con una morfología de ADN degradado que indica un alto número de roturas (Figuras 16 y 17). Estos resultados son coherentes con la relación existente entre la movilidad y los niveles de SSB (90).

El subgrupo de espermatozoides con **alteraciones en la pieza intermedia** también presentó un valor significativamente mayor que las muestras de eyaculado, Swim-up e ICSI-S. Este aumento podría estar relacionado con una alteración en las mitocondrias que se encuentran en esta localización que también podría aumentar el estrés oxidativo (48). El incremento de SSB en espermatozoides con una alteración en la pieza intermedia, pero móviles, no fue tan intenso como en el caso de los espermatozoides inmóviles. Este hecho podría indicar que no todos los espermatozoides de este grupo habían sufrido daños en su ADN por el estrés oxidativo que se pudo producir en la pieza intermedia. Sería esperable que, al evaluar estos mismos espermatozoides tras unas horas, se hubiera observado un incremento de los valores de SSB, así como una disminución de su movilidad, cuando el exceso de ROS en la pieza intermedia pueda acceder al ADN nuclear (132–134).

Por último, el subgrupo con **alteraciones en la morfología de la cabeza** presentó valores significativamente más elevados de SSB que las muestras de eyaculado, Swim-up e ICSI-S. La hipercondensación de la cromatina gracias a su unión a protaminas permite obtener un tamaño muy reducido en la cabeza del espermatozoide (~5µm de largo) (1). Se ha descrito que esta hipercondensación permite proteger la integridad del ADN paterno hasta su descompactación tras la fecundación (60,61). Así pues, una mala compactación de la cromatina podría estar relacionada con una morfología anómala de la cabeza del espermatozoide (91,135–137). A su vez, una cromatina mal compactada podría ser más accesible a los agentes causantes de roturas en el ADN (67).

Estos resultados podrían respaldar la existencia de un **daño iatrogénico** producido durante la manipulación de la muestra de seminal al realizarse pasos de centrifugación (118). Este daño no parece afectar a los valores de fragmentación en porcentaje ya que la muestra de Swim-up presenta valores inferiores de SSB respecto al eyaculado. No obstante, sí podría incrementarse el número de roturas en los espermatozoides con cromatina previamente comprometida, aumentando el número de espermatozoides con ADN degradado (67). Afortunadamente, el proceso de Swim-up junto con la selección de un espermatozoide con movilidad óptima en ciclos de ICSI parecen evitar satisfactoriamente este daño en el ADN de los espermatozoides (Figura 22 y Figura 2a en el artículo correspondiente al Proyecto 1.2).

En cuanto a los valores de **DSB**, los resultados también muestran un aumento significativo de estos valores en los tres tipos de ICSI-N respecto a las muestras de eyaculado, Swim-up e ICSI-S (Figura 23). Los espermatozoides con **alteraciones en la cabeza** han mostrado el mayor valor de DSB de todos los grupos. De nuevo, esta situación puede estar relacionada con la presencia de una cromatina mal compactada que se pueda relacionar con una morfología de la cabeza alterada (136). En una cromatina inmadura serían más accesibles las enzimas que producen cortes del tipo DSB, generando también un mayor número de espermatozoides con ADN degradado (Figuras 16 y 17).

Los valores de DSB en los espermatozoides con **alteraciones en la pieza intermedia** y en **espermatozoides inmóviles** también fueron elevados. Aunque no hay evidencia de una relación directa entre la movilidad de los espermatozoides, el estrés oxidativo y los niveles de DSB, sí está descrito que el mecanismo de apoptosis abortiva puede ser activado por un incremento de ROS (75,96). Este mecanismo de muerte celular activa endonucleasas que generan DSB en el ADN espermático (75). Así pues, el número de espermatozoides con un alto número de roturas DSB,

y que se pueden considerar degradados, podría estar relacionado con espermatozoides muertos que también presenten altos valores de SSB.

Los resultados obtenidos en el Proyecto 1.3 corroboran la necesidad de seleccionar espermatozoides con buena morfología y movilidad para realizar ciclos de reproducción asistida, es decir, ICSI-S. Como se había visto en los Proyectos 1.2 y 1.3, al escoger estos espermatozoides se evita en gran medida el daño del tipo SSB. Además, se puede evitar escoger espermatozoides apoptóticos o ya muertos que presenten un ADN degradado por un alto número de roturas SSB y DSB. No obstante, si un espermatozoide tiene una buena morfología y mantiene su movilidad, no queda exento de contener DSB en su ADN.

5.4. En ciclos de ICSI, las roturas del tipo SSB afectan a la tasa de fecundación, mientras que las roturas del tipo DSB afectan a la tasa de euploidía

Tras comprobar que la preparación de la muestra seminal y el procedimiento de selección espermática durante los ciclos de ICSI afecta de forma distinta a los niveles de fragmentación del tipo SSB y DSB, se estudió el efecto de ambos tipos de roturas en ciclos de ICSI de parejas infértiles. En concreto, se estudiaron las tasas de fecundación y de euploidía en el **Proyecto 2**.

Tras analizar los resultados reproductivos y los niveles de fragmentación mediante el test Comet en un total de 167 parejas infértiles, se ha observado que la presencia de niveles elevados de SSB en el eyaculado se asocia a una menor **tasa de fecundación** en ciclos de ICSI, en comparación a varones con niveles normales de **SSB** pese al uso de un sistema convencional de preparación seminal (Tabla 1 en el artículo correspondiente al Proyecto 2). Estos resultados sugieren que la presencia de SSB en el ADN paterno dificulta las fases más iniciales del desarrollo embrionario. Este resultado estaría en acuerdo con investigaciones previas donde se vio una relación entre

los valores elevados de SSB, valores elevados de ROS y una menor capacidad de conseguir un embarazo de forma natural o tras un TRA (138,139).

Como se observa en las Figuras 22 y 2a en el artículo correspondiente al Proyecto 1.2, pese a que el procedimiento de preparación seminal y la selección espermática disminuyen los niveles de SSB, este valor no se reduce totalmente. Así pues, la selección de un espermatozoide móvil no descarta completamente la presencia de SSB en el ADN. Además, si se selecciona un espermatozoide móvil, pero no de movilidad óptima, éste también puede presentar SSB en su ADN interfiriendo en el proceso de desarrollo tras la microinyección.

En cuanto al efecto de las roturas del tipo **DSB** en los ciclos de ICSI, se ha observado una disminución significativa de la **tasa de euploidía** cuando los niveles de DSB eran elevados en el eyaculado (Tabla 2 en el artículo correspondiente al Proyecto 2). Según los resultados del Proyecto 1.2, este daño detectado en el eyaculado estaría también presente, y en igual proporción, en los espermatozoides finalmente utilizados para fecundar los ovocitos. Aunque los ovocitos tienen cierta capacidad de reparar los DSB, esta reparación es propensa al error ya que no dispone de un molde de referencia y se pueden generar alteraciones cromosómicas de origen paterno en el embrión (65). Además, el nivel de daño en cada espermatozoide también podría tener un papel importante en la evolución del embrión. Sería posible que un daño moderado y localizado en las regiones MAR pudiera ser más fácilmente reparable por la maquinaria del ovocito al quedar las dos secuencias de ADN cercanas y ancladas a la matriz nuclear. Por el contrario, un daño extensivo podría resultar en reorganizaciones complejas en el genoma paterno de forma incompatible con la supervivencia del embrión (Figuras 11 y 14). Estos resultados podrían estar relacionados con estudios previos que detectaron retrasos en la cinética embrionaria, bloqueo embrionario, fallos de implantación o abortos de repetición tras la fecundación con espermatozoides de muestras con elevados valores de DSB (93,97,130).

El efecto de la **edad materna** junto con el efecto de la presencia de DSB también se estudió en este proyecto (Tabla 3 en el artículo correspondiente al Proyecto 2). Está ampliamente descrito que el número de aneuploidías en los ovocitos aumenta con la edad de la mujer, especialmente a partir de los 35 años, coincidiendo con el declive de su fertilidad (65,140) (Figura 6). Los resultados muestran que aquellas mujeres menores de 35 años cuyas parejas presentaban niveles normales de DSB obtenían la mejor tasa de embriones euploides. Mujeres de mayor edad presentaban una disminución significativa en la tasa de euploidía pese a que sus parejas tenían valores normales de DSB, indicando el efecto del factor femenino. Cuando los varones presentaban valores alterados de DSB, las parejas con mujeres menores de 35 años presentaban también una disminución de la euploidía embrionaria, mostrando el efecto del factor masculino. Si además las mujeres eran mayores, se detectaron los niveles más bajos de euploidía, evidenciando el efecto conjunto de los factores femenino y masculino. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre la disminución de la tasa de euploidía por efecto de la edad materna (mujeres de más de 35 años y varones con niveles normales de DSB) y por efecto de la presencia de DSB (mujeres menores de 35 años y varones con niveles alterados de DSB). De forma coherente, este resultado sugiere que el factor masculino y el femenino contribuyen a la euploidia del embrión en proporción similar.

En futuros estudios sería interesante determinar si la aneuploidía de origen materno y paterno son del mismo tipo o si, por el contrario, la aneuploidía materna se presenta en forma de falta o exceso de cromosomas enteros por errores en el huso mitótico (65,140) y la aneuploidía paterna se presenta en forma de reorganizaciones complejas entre cromosomas, posiblemente derivadas de roturas del tipo DSB (89) (Figura 14).

5.5. Las tasas de fecundación y euploidía en ciclos de ICSI mejoran tras el uso de un dispositivo microfluídico

Tras estudiar el efecto de las roturas en el ADN sobre las tasas de fecundación y euploidía, en el **Proyecto 2** también se compararon los resultados obtenidos tras utilizar un método convencional de preparación espermática (en este caso, Gradientes de densidad), con el uso de un **dispositivo microfluídico** (Figura 20). Estos nuevos dispositivos han mostrado resultados prometedores en cuanto a la disminución de la fragmentación del ADN espermático. En concreto, el dispositivo ZyMöt™ICSI ha sido el único que ha mostrado ser capaz de reducir ambos tipos de roturas hasta el momento (119,120).

Se ha observado que el uso de este dispositivo permite aumentar la **tasa de fecundación** en pacientes con valores elevados de SSB, llegando al mismo nivel que pacientes con valores normales (Tabla 1 en el artículo correspondiente al Proyecto 2). De forma coherente con los resultados de Quinn y col. y los resultados obtenidos en el Proyecto 1.2, el proceso de preparación de la muestra mediante el sistema microfluídico, junto con la microselección espermática de espermatozoides con movilidad óptima, podrían haber reducido casi en su totalidad la proporción de espermatozoides con SSB, minimizando el efecto de este daño sobre la tasa de fecundación (119).

Tras la fecundación, en los ciclos de ICSI se puede evaluar la euploidía de los embriones en estadio de blastocisto mediante el PGT-A. Este procedimiento permite detectar aquellos embriones con alteraciones genéticas, pero no permite por sí mismo obtener más embriones sanos. Es por ello que el uso de gametos con buena integridad genética es de vital importancia para asegurar la viabilidad de los embriones. En el Proyecto 2 también se evaluó el efecto del dispositivo microfluídico sobre la **tasa de euploidía** cuando los varones presentaban valores

elevados de DSB. En comparación con el uso de los Gradientes de densidad, se observó una mejora de la tasa de euploidía con el sistema microfluídico. Esta mejora no presentó diferencias significativas respecto a la tasa obtenida por pacientes con valores normales de DSB (Tabla 2 en el artículo correspondiente al Proyecto 2).

Aunque no se obtuvieron valores estadísticamente diferentes, la tasa de euploidia tras el uso del dispositivo microfluídico no llegó al mismo valor que la tasa obtenida por pacientes con niveles de DSB normales. En el estudio de Pujol y col. de 2021 se observó una reducción significativa del nivel de DSB tras el uso del dispositivo ZyMöt™ICSI en comparación con los valores iniciales encontrados en el eyaculado. No obstante, esta disminución no fue completa (reducción aproximada del 46%). Así pues, la preparación de la muestra seminal con el dispositivo microfluídico permitiría el paso de algunos espermatozoides con DSB que podrían ser microseleccionados más tarde durante el proceso de ICSI al presentar buena movilidad. Contra mayor sea el valor de DSB en el eyaculado, más número de espermatozoides dañados podrían llegar al final del dispositivo. Este problema no se presentaría en el caso de roturas del tipo SSB y la tasa de fecundación puesto que el dispositivo microfluídico reduce casi completamente este tipo de daño y, además, luego se aplica un proceso de selección para aspirar un espermatozoide con movilidad óptima y, asimismo, libre de SSB. De todas formas, el estudio de un mayor número de pacientes sería de interés para confirmar los resultados observados.

Combinado con el efecto de la **edad materna**, se observó que el uso del dispositivo microfluídico en mujeres menores de 35 años aumentó significativamente la tasa de euploidía respecto al uso de Gradientes de densidad, pese a que los varones presentaban valores elevados de DSB. Aunque no mostraron diferencias estadísticamente significativas, se obtuvo un número mayor de embriones euploides utilizando el dispositivo ZyMöt™ICSI en muestras con DSB que en

muestras con valores normales de DSB. Cabe tener en cuenta que las muestras con un resultado de normalidad tras analizar los niveles de DSB presentan un cierto porcentaje de espermatozoides afectados. Aunque en bajo número, estos espermatozoides podrían ser también móviles y ser seleccionados para realizar la ICSI.

Cuando las mujeres tenían más de 35 años, el dispositivo microfluídico aumentó la tasa de euploidía respecto al uso de Gradientes de densidad, aunque sin llegar al nivel de las mujeres más jóvenes (Tabla 3 en el artículo correspondiente al Proyecto 2). De forma coherente con la literatura, estos resultados podrían indicar que los ovocitos de mujeres más jóvenes tienen una mayor capacidad de reparar los DSB en el ADN paterno, sobre todo cuando están en bajo número (65). En cambio, ovocitos de mujeres mayores de 35 años podrían tener dificultades para reparar este daño aunque se haya reducido respecto a los valores iniciales en el eyaculado, además de aportar un genoma materno con más alteraciones (64).

Así pues, los resultados obtenidos en el Proyecto 2 muestran que el dispositivo microfluídico ZyMōt™ICSI reduce significativamente los efectos del daño del tipo SSB en el ADN paterno en comparación al efecto de los Gradientes de densidad. Posiblemente este efecto se deba a que la selección microfluídica es un método de preparación espermática más eficiente en la reducción del este daño que los métodos convencionales basados en movilidad, como observaron Quinn y col. (119). En cuanto a las roturas del tipo DSB, solo el sistema microfluídico ha mostrado ser capaz de reducir su impacto en la viabilidad de los embriones. En cambio, el uso del método convencional mostró una menor tasa de euploidía. Este resultado podría deberse a la reducción de los valores de DSB tras el uso del método microfluídico, como se observó en el reciente artículo de Pujol y col., a diferencia del método convencional que no mostró ninguna reducción significativa (120).

5.6. Los resultados clínicos en ciclos de ICSI mejoran tras el uso de un dispositivo microfluídico cuando los varones presentan niveles elevados de DSB

El efecto de las roturas del tipo DSB en el ADN espermático también se estudió en relación a los resultados clínicos (tasa de embarazo bioquímico; tasa de embarazo clínico; tasa de nacido vivo y tasa de aborto) tras la aplicación de tratamientos de ICSI en el **Proyecto 3**.

Este procedimiento de reproducción asistida se ideó originalmente para tratar el factor masculino severo (124). En las últimas décadas, su uso se ha extendido para tratar diferentes casos de infertilidad por diferentes razones, entre ellas la posibilidad de estandarizar procedimientos y tiempos en el laboratorio (125). Pese a la selección de espermatozoides de buena morfología y motilidad, las tasas de éxito de los ciclos de ICSI no son óptimas (125). Algunos autores sugieren que este hecho podría deberse a que la fecundación se da de forma forzada, saltándose todos los pasos de la fecundación natural, desde su tránsito por el tracto reproductor femenino hasta la fecundación en sí misma. De alguna forma, este proceso podría seleccionar espermatozoides con buena integridad genética para llegar hasta el ovocito (141,142).

Se estudiaron 28 parejas cuyos varones presentaban valores elevados de DSB. Estas parejas realizaron dos ciclos de ICSI consecutivos: en el primero se utilizaron métodos de preparación espermática convencionales (una combinación de Gradientes de densidad y Swim-up), mientras que en el segundo se utilizó el dispositivo microfluídico ZyMōt™ICSI. Los resultados muestran que las tasas de embarazo bioquímico, embarazo clínico y de nacido vivo fueron mejores en el segundo ciclo. La tasa de aborto fue menor en el segundo ciclo.

La presencia de roturas del tipo DSB se ha asociado anteriormente a un retraso en la cinética embrionaria y a un elevado riesgo de abortos de repetición (93,97). Así pues, al comparar las mismas parejas usando ambos tipos de preparación espermática, los resultados obtenidos refuerzan la idea de que el daño del tipo DSB en el ADN de los espermatozoides no se puede evitar mediante la preparación convencional de la muestra de semen ni durante la selección espermática en ICSI. En cambio, el dispositivo ZyMöt™ICSI sí sería capaz de reducir este daño y, por lo tanto, podría evitar el efecto nocivo de los DSB en el desarrollo embrionario.

5.7. Manejo de pacientes con fragmentación en el ADN espermático

Numerosos autores ponen de manifiesto que ante una pareja infértil es de vital importancia realizar una evaluación inicial exhaustiva a ambos miembros de la pareja para encontrar los posibles factores que estén afectando a su fertilidad. En el caso masculino, el estudio de los parámetros seminales puede suponer una primera herramienta para encontrar alteraciones en la formación de los gametos. No obstante, un resultado de normozoospermia no debería extrapolarse a un estado de fertilidad óptimo. Así pues, optar por una evaluación que incluya el estudio de la fragmentación del ADN espermático podría ser útil para diagnosticar pacientes infértiles y para ofrecer un tratamiento acorde a la patología encontrada.

A continuación, se muestra un esquema resumen del posible manejo de pacientes tras el estudio de fragmentación, basado en los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral y en relación a la bibliografía previamente publicada.

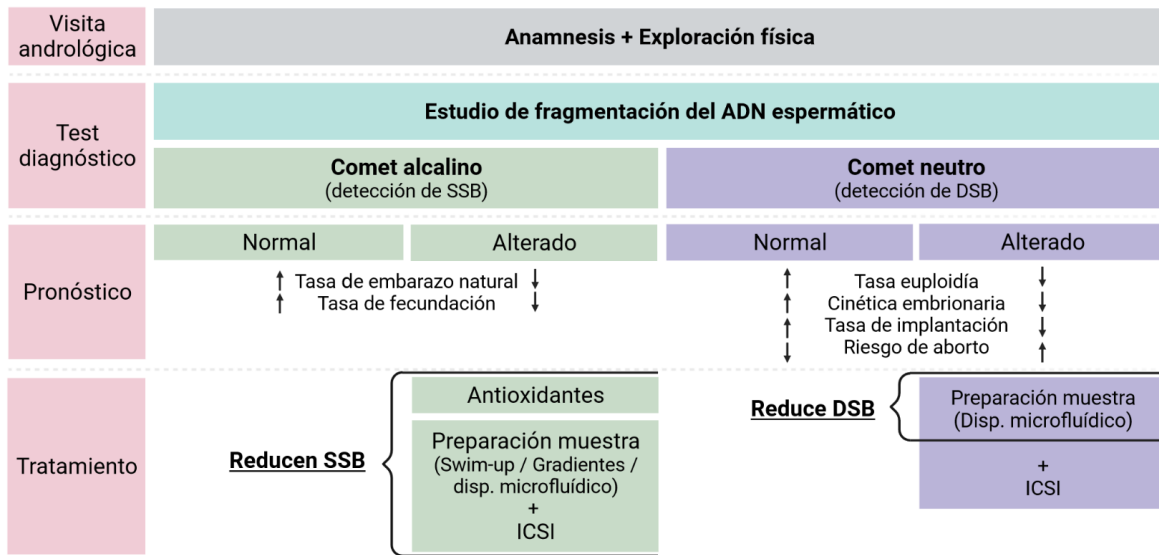


Figura 24. Pronóstico y posible tratamiento efectivo en pacientes infértiles tras la determinación de los niveles de fragmentación del ADN espermático de cadena sencilla (SSB) y de cadena doble (DSB) mediante el test Comet.

5.8. Perspectivas de futuro

5.8.1. Utilidad del diagnóstico de la fragmentación del ADN espermático

Durante la consecución de los distintos proyectos que conforman la presente Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto la utilidad clínica del diagnóstico de la fragmentación del ADN espermático de cadena sencilla y cadena doble. Este diagnóstico permite al personal médico ofrecer una explicación a la infertilidad que sufre un varón y su pareja. Además, tras una revisión andrológica completa y el estudio de fragmentación podrían reducirse el número de casos de infertilidad idiopática y ofrecer un tratamiento específicamente dirigido a su alteración. En el caso de presentar niveles alterados de DSB y de aplicar el dispositivo microfluídico para seleccionar espermatozoides antes de un ciclo de ICSI, el diagnóstico del porcentaje de espermatozoides afectados podría ser de gran utilidad para el personal médico y del laboratorio de embriología para ofrecer una previsión de éxito más realista a la pareja y para adaptar el manejo de la muestra seminal durante la ICSI.

Por otro lado, la obtención de un diagnóstico temprano antes de iniciar procesos de reproducción asistida podría reducir el tiempo de espera de una pareja hasta la posible paternidad al evitar fallos en estos ciclos.

5.8.2. Líneas de investigación

Como se ha demostrado en el Proyecto 1, el estudio de espermatozoides seleccionados aptos para ICSI (ICSI-S) es viable mediante adaptaciones metodológicas de los test diagnósticos. Esto abre la posibilidad de iniciar líneas de investigación para el estudio de diversos marcadores espermáticos que permitan diferenciar una población fértil de una infértil, o incluso dentro de la población infértil discriminar entre casos con falta de embarazo o con abortos de repetición. Estos nuevos marcadores deberían demostrar su presencia en la subpoblación de espermatozoides ICSI-S para ser útiles en la predicción del resultado del ciclo de ICSI.

En relación a los Proyectos 2 y 3 y la asociación encontrada entre los niveles DSB y un aumento de la aneuploidía en los embriones, sería de gran interés estudiar las alteraciones concretas encontradas en estos embriones. También sería de interés el estudio de la posible correlación entre la morfocinética del embrión y la presencia de aneuploidías para testar si los embriones con alteraciones muestran una graduación de calidad menor según los criterios de clasificación de ASEBIR.

En relación a la selección espermática mediante el dispositivo microfluídico ZyMōt™ICSI y los efectos positivos encontrados sobre la tasa de fecundación, la euploidía embrionaria y la tasa de embarazo, los resultados apuntan a que se puede deber a la disminución de los niveles de fragmentación cadena sencilla y cadena doble. Otros sistemas de selección espermática que puedan surgir en el mercado deberían demostrar, siguiendo un procedimiento similar al presentado en estos proyectos, que puede reducir la fragmentación y que esto se traduce en mejores resultados reproductivos, desde la tasa de fecundación hasta la tasa de nacido vivo.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral se describen a continuación.

Sobre el primer objetivo principal - Proyecto 1 (partes 1.1, 1.2 y 1.3)

1. Las técnicas de análisis de la fragmentación del ADN espermático Comet neutro, Comet alcalino, SCD y TUNEL se pueden adaptar para estudiar espermatozoides microseleccionados obteniendo buenas eficiencias de recuperación y análisis.
2. Existe un sesgo diagnóstico en la determinación de la fragmentación del ADN espermático en el eyaculado respecto a la subpoblación de espermatozoides utilizados en ICSI: la proporción de ICSI-S con roturas del tipo SSB es significativamente menor que en eyaculado, mientras que se mantiene la misma proporción de espermatozoides con roturas del tipo DSB.
3. Los pacientes que no consiguen un embarazo o que han presentado fallos de implantación tras realizar TRA presentan valores incrementados de SSB. Los pacientes con antecedentes de abortos presentan valores incrementados de DSB.
4. El test Comet en sus versiones alcalina y neutra para detectar SSB y DSB, respectivamente, ha mostrado mayor capacidad de detección y diferenciación de ambos tipos de rotura, en comparación con las técnicas SCD y TUNEL.
5. Los espermatozoides que presentan alteraciones en su morfología o motilidad (ICSI-N) presentan valores incrementados de roturas del tipo SSB y DSB que podrían relacionarse con un exceso de estrés oxidativo y la activación del proceso de apoptosis abortiva.

Sobre el segundo objetivo principal - Proyectos 2 y 3

6. La presencia de SSB en el ADN espermático reduce la tasa de fecundación, mientras que la presencia de DSB reduce la tasa de euploidía en los embriones tras realizar ciclos de ICSI.
7. La edad ovocitaria tiene un papel crucial en la tasa de euploidía. Mujeres menores de 35 años presentan mejores tasas de euploidía que las mujeres de mayor edad. La presencia de DSB tiene un papel estadísticamente igual de importante en esta tasa.
8. El uso del dispositivo microfluídico ZyMöt™ICSI permite mejorar las tasas de fecundación y euploidia en pacientes con valores elevados de SSB y DSB en el eyaculado, respectivamente.
9. La mejora en las tasas de euploidía tras el uso del dispositivo microfluídico ZyMöt™ICSI se da especialmente cuando la pareja femenina es menor de 35 años. En combinación con ovocitos de mujeres mayores de 35 años, también se mejoran las tasas de euploidía, aunque sigue presente el factor femenino por efecto de la edad materna.
10. Cuando el varón presenta valores elevados de DSB, el uso de métodos como los Gradientes de densidad o el Swim-up para la preparación de la muestra seminal en ciclos de ICSI resulta en tasas reducidas de embarazo y de niños nacidos vivos, y un número elevado de abortos.
11. En comparación con métodos convencionales, el uso del dispositivo microfluídico ZyMöt™ICSI permite mejorar las tasas de embarazo y de nacido vivo, así como disminuir la tasa de abortos en ciclos de ICSI de pacientes con valores elevados de DSB.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
2. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Genetics and Male Infertility. In: Dubey A, editor. *Infertility, Diagnosis, Management and IVF*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2012. p. 113–57.
3. Johnson MH. *Essential Reproduction*. 6th ed. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd; 2007.
4. de Jonge CJ, Barratt CLR. *The Sperm Cell*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.
5. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum Reprod* 1998;13(1):1–8.
6. Cheng CY, editor. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. 1st ed. New York: Springer Science; 2008.
7. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* 2016;59:10–26.
8. Pollister A, Mirsky A. The nucleoprotamine of trout sperm. *J Gen Physiol* 1946;30(2):101–16.
9. Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl* 2012;35(2):109–24.
10. Bendsen E, Byskov AG, Andersen CY, Westergaard LG. Number of germ cells and somatic cells in human fetal ovaries during the first weeks after sex differentiation. *Hum Reprod* 2006;21(1):30–5.
11. Lutterodt MC, Sørensen KP, Larsen KB, Skouby SO, Andersen CY, Byskov AG. The number of oogonia and somatic cells in the human female embryo and fetus in relation to whether or not exposed to maternal cigarette smoking. *Hum Reprod* 2009;24(10):2558–66.
12. Larose H, Shami AN, Abbott H, Manske G, Lei L, Hammoud SS. Gametogenesis: A journey from inception to conception. In: Wassarman PM, editor. *Current Topics in Developmental Biology*. New York: Elsevier Inc.; 2019. p. 257–310.
13. The American College of Obstetricians and Gynaecologists Committee of the ASRM. Female age-related fertility decline. *Fertil Steril* 2014;101(3):633–4.
14. Wallace WHB, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One* 2010;5(1):1–9.
15. World Health Organization. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health*

- Problems [Internet]. 2021 [cited 2018 Jul 30]; Available from: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http://id.who.int/icd/entity/1237004558>
16. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 2018;62(2):2–10.
 17. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13(1):1–9.
 18. Leaver RB. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *Br J Nurs* 2016;25(18):35–41.
 19. Harris ID, Fronczak C, Roth L, Meacham RB. Fertility and the aging male. *Rev Urol* 2011;13(4):e184-90.
 20. Brandt JS, Cruz Ithier MA, Rosen T, Ashkinadze E. Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: A review of the literature. *Prenat Diagn* 2019;39(2):81–7.
 21. Virtanen HE, Jørgensen N, Toppari J. Semen quality in the 21 st century. *Nat Rev Urol* 2017;14(2):120–30.
 22. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995;332(5):281–5.
 23. Andolz P, Bielsa MA, Vila J. Evolution of semen quality in North-eastern Spain: A study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod* 1999;14(3):731–5.
 24. Schwartz D, Mayaux MJ, Spira A, Moscato ML, Jouannet P, Czyglik F, et al. Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men. *Fertil Steril* 1983;39(4):530–5.
 25. Elzanaty S. Association between age and epididymal and accessory sex gland function and their relation to sperm motility. *Arch Androl* 2007;53(3):149–56.
 26. Stanworth RD, Jones TH. Testosterone for the aging male; current evidence and recommended practice. *Clin Interv Aging* 2008;3(1):25–44.
 27. Vakalopoulos I, Dimou P, Anagnostou I, Zeginiadou T. Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. *Hormones* 2015;14(4):579–89.
 28. Enciso M, Alfarawati S, Wells D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod* 2013;28(6):1707–15.
 29. Gill K, Kups M, Harasny P, Machalowski T, Grabowska M, Lukaszuk M, et al. The negative impact

- of varicocele on basic semen parameters, sperm nuclear dna dispersion and oxidation-reduction potential in semen. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18(11):1–16.
30. Kang C, Punjani N, Lee RK, Li PS, Goldstein M. Effect of varicoceles on spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2021;1(6):1–11.
 31. Katz DJ, Teloken P, Shoshany O. Male infertility - The other side of the equation. *Aust Fam Physician* 2017;46(9):641–6.
 32. Ajayi AF, Akhigbe RE. The physiology of male reproduction: Impact of drugs and their abuse on male fertility. *Andrologia* 2020;52(9):1–25.
 33. Vanderhout SM, Panah MR, Garcia-Bailo B, Grace-Farfaglia P, Samsel K, Dockray J, et al. Nutrition, genetic variation and male fertility. *Transl Androl Urol* 2021;10(3):1410–31.
 34. Dai JB, Wang ZX, Qiao ZD. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian J Androl* 2015;17(6):954–60.
 35. Pajarinen JT, Karhunen PJ. Common Alcohol-Induced Disorders of the Human Testis. *Int J Androl* 1984;17:292–9.
 36. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9(4):331–45.
 37. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12(4):417–35.
 38. Gunes S, Arslan MA, Hekim GNT, Asci R. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2016;33(5):553–69.
 39. Simon L, Emery BR, Carrell DT. Sperm DNA fragmentation consequences for reproduction. *Adv Exp Med Biol* 2019;1166:87–105.
 40. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J, et al. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* 2012;27(3):652–8.
 41. Dhanoa JK, Mukhopadhyay CS, Arora JS. Y-chromosomal genes affecting male fertility: A review. *Vet World* 2016;9(7):783–91.
 42. Samplaski MK, Agarwal A, Sharma R, Sabanegh E. New generation of diagnostic tests for infertility: Review of specialized semen tests. *Int J Urol* 2010;17(10):839–47.
 43. Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet* 2008;24(2):86–93.

44. Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: A review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* 2014;101(3):656-663.e1.
45. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996;11(10):2217-22.
46. Dun EC, Nezhat CH. Tubal factor infertility - Diagnosis and management in the era of Assisted Reproductive Technology. *Obs Gynecol Clin North Am* 2012;39(4):551-66.
47. Pacheco de Melo K, Camargo M. Mechanisms for sperm mitochondrial removal in embryos. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2021;1868(2):118916.
48. Baskaran S, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. Reactive oxygen species in male reproduction: A boon or a bane? *Andrologia* 2021;53(1):1-12.
49. Sawyer DE, Roman SD, Aitken RJ. Relative susceptibilities of mitochondrial and nuclear DNA to damage induced by hydrogen peroxide in two mouse germ cell lines. *Redox Rep* 2001;6(3):182-4.
50. Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol* 1999;48(4):427-34.
51. Gogvadze V, Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem Biol Interact* 2006;163(1-2):4-14.
52. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health* 2014;32(1):1-17.
53. Ward WS. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 1993;48(6):1193-201.
54. Aitken R, De Iulii G. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2010;16(1):3-13.
55. Ward WS, Partin AW, Coffey DS. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 1989;98(3):153-9.
56. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010;16(1):30-6.
57. Hud N V, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R. Identification of the elemental packing unit of

- DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193(3):1347–54.
58. Sotolongo B, Lino E, Ward WS. Ability of Hamster Spermatozoa to Digest Their Own DNA. *Biol Reprod* 2003;69(6):2029–35.
 59. Zalenskaya IA, Zalensky AO. Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome Res* 2004;12(2):163–73.
 60. Mudrak OS, Nazarov IB, Jones EL, Zalensky AO. Positioning of chromosomes in human spermatozoa is determined by ordered centromere arrangement. *PLoS One* 2012;7(12):e52944.
 61. Zalensky AO, Allen MJ, Kobayashi A, Zalenskaya IA, Balhórn R, Bradbury EM. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 1995;103(9):577–90.
 62. Agarwal A, Majzoub A, Baskaran S, Selvam MKP, Cho CL, Henkel R, et al. Sperm DNA fragmentation: A new guideline for clinicians. *World J Mens Health* 2020;38(4):412–71.
 63. Ribas-Maynou J, Benet J. Single and double strand sperm DNA damage: Different reproductive effects on male fertility. *Genes (Basel)* 2019;10(2):1–13.
 64. Gunes S, Sertyel S. Sperm DNA Damage and Oocyte Repair Capability. *A Clin Guid to Sperm DNA Chromatin Damage* 2018;321–46.
 65. García-Rodríguez A, Gosálvez J, Agarwal A, Roy R, Johnston S. DNA damage and repair in human reproductive cells. *Int J Mol Sci* 2019;20(1):1–22.
 66. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999;284(6):696–704.
 67. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93(4):1027–36.
 68. Cooper TJ, Wardell K, Garcia V, Neale MJ. Homeostatic regulation of meiotic DSB formation by ATM/ATR. *Exp Cell Res* 2014;329:124–31.
 69. Agarwal A, Barbăroşie C, Ambar R, Finelli R. The impact of single-and double-strand DNA breaks in human spermatozoa on assisted reproduction. *Int J Mol Sci* 2020;21(11):1–14.
 70. McPhersson SMG, Longo FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: Possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev. Biol.* 1993;158(1):122–30.
 71. Laberge RM, Boissonneault G. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* 2005;73(2):289–96.

72. Middelkamp S, van Tol HTA, Spierings DCJ, Boymans S, Guryev V, Roelen BAJ, et al. Sperm DNA damage causes genomic instability in early embryonic development. *bioRxiv* 2019;(April):1–12.
73. Braun RE. Every sperm is sacred - Or is it? *Nat Genet* 1998;18(3):202–4.
74. Russell LD, Peterson RN. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil* 1984;70(2):635–41.
75. De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009;81(3):517–24.
76. Thornberry NA, Yurkiewicz L. Caspases : Enemies Within. *Science* (80-) 1998;281(8):1312–7.
77. Sakkas D, Mariethoz E, St. John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999;251(2):350–5.
78. 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(1):105–9.
79. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, et al. Nuclear degraded sperm subpopulation is affected by poor chromatin compaction and nuclease activity. *Andrologia* 2015;47(3):286–94.
80. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment : A new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol* 2011;60(4):796–808.
81. 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(1):226–30.
82. Lobascio AM, De Felici M, Anibaldi M, Greco P, Minasi MG, Greco E. Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology* 2015;3(2):265–70.
83. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 2008;23(5):1044–52.
84. Kesari KK, Agarwal A, Henkel R. Radiations and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2018;16(1):1–

- 16.
85. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. The association of glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with idiopathic male infertility. *J Hum Genet* 2010;55(9):565–70.
 86. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002;78(2):313–8.
 87. The practice committee of the ASRM. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: A guideline. *Fertil Steril* 2013;99(3):673–7.
 88. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21(11):2876–81.
 89. Gawecka JE, Marh J, Ortega M, Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS. Mouse Zygotes Respond to Severe Sperm DNA Damage by Delaying Paternal DNA Replication and Embryonic Development. *PLoS One* 2013;8(2):e56385.
 90. Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Amar E, Zini A. Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertil Steril* 2014;101(6):1588–93.
 91. Gosálvez J, Migueles B, López-Fernández C, Sánchez-Martín F, Sáchez-Martín P. Single sperm selection and DNA fragmentation analysis: The case of MSOME/IMSI. *Nat Sci* 2013;05(07):7–14.
 92. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SEM. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod* 2010;25(7):1594–608.
 93. Casanovas A, Ribas-Maynou J, Lara-Cerrillo S, Jimenez-Macedo AR, Hortal O, Benet J, et al. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertil Steril* 2019;111(4):699-707.e1.
 94. Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SEM. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril* 2011;95(2):652–7.
 95. Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, et al. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 2013;26(1):68–78.
 96. Coban O, Serdarogullari M, Yarkiner Z, Serakinci N. Investigating the level of DNA double-strand

- break in human spermatozoa and its relation to semen characteristics and IVF outcome using phospho-histone H2AX antibody as a biomarker. *Andrology* 2019;8(2):421–6.
97. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernandez-Encinas A, Amengual MJ, Prada E, Cortés P, et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* 2012;7(9):1–9.
 98. Garolla A, Cosci I, Bertoldo A, Sartini B, Boudjema E, Foresta C. DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online* 2015;31(1):100–7.
 99. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013;1(5):715–22.
 100. Eisenberg ML, Lathi RB, Baker VL, Westphal LM, Milki AA, Nangia AK. Frequency of the male infertility evaluation: Data from the national survey of family growth. *J Urol* 2013;189(3):1030–4.
 101. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2009;16(3):231–45.
 102. Baker HWG, Burger HG, de Kretser DM, Lording DW, McGowan P, Rennie GG. Factors affecting the variability of semen analysis results in infertile men. *Int J Androl* 1981;4(1–6):609–22.
 103. World Health Organization. Examination and processing of human semen. World Health Organization Press 2010;5th Ed.
 104. Santi D, Spaggiari G, Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses. *Reprod Biomed Online* 2018;37(3):315–26.
 105. Templado C, Vidal F, Estop A. Aneuploidy in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2011;133(2–4):91–9.
 106. Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F. Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility - a review. *Placenta* 2003;24 Suppl B:S62-5.
 107. World Health Organization. Examination and processing of human semen. World Health Organization Press 2021;6th Ed.
 108. Rex AS, Aagaard J, Fedder J. DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology* 2017;5(4):622–30.

109. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci* 2016;169:56–75.
110. Simon L, Aston KI, Emery BR, Hotaling J, Carrell DT. Sperm DNA damage output parameters measured by the alkaline Comet assay and their importance. *Andrologia* 2017;49(2):e12608.
111. 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 test. *Am Soc Reprod Med* 2005;84(4):833–42.
112. Majzoub A, Agarwal A. Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate. *Arab J Urol* 2018;16:113–24.
113. Gual-Frau J, Abad C, Amengual MJ, Hannaoui N, Checa MA, Ribas-Maynou J, et al. Oral antioxidant treatment partly improves integrity of human sperm DNA in infertile grade I varicocele patients. *Hum Fertil* 2015;18(3):225–9.
114. 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(3):211–6.
115. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell D. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl* 2017;19(1):80–90.
116. Lara-Cerrillo S, Gual-Frau J, Benet J, Abad C, Prats J, Amengual MJ, et al. Microsurgical varicolectomy effect on sperm telomere length, DNA fragmentation and seminal parameters. *Hum Fertil* 2020;9:1–7.
117. Oguz Y, Guler I, Erdem A, Mutlu MF, Gumuslu S, Oktem M, et al. The effect of swim-up and gradient sperm preparation techniques on deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation in subfertile patients. *J Assist Reprod Genet* 2018;35(6):1083–9.
118. Muratori M, Tarozzi N, Cambi M, Boni L, Iorio AL, Passaro C, et al. Variation of DNA Fragmentation Levels during Density Gradient Sperm Selection for Assisted Reproduction Techniques. *Med (United States)* 2016;95(20):1–9.
119. Quinn MM, Jalalian L, Ribeiro S, Ona K, Demirci U, Cedars MI, et al. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum Reprod* 2018;33(8):1388–93.

120. Pujol Masana A, García-Peiró A, Ribas-Maynou J, Lafuente R, Mataró D, Vassena R. A microfluidic sperm-sorting device reduces the proportion of sperm with double strand DNA fragmentation. *Zygote* 2021;1(1):1–6.
121. Sociedad Española de Fertilidad. Registro Nacional de Actividad - Informe estadístico de técnicas de reproducción humana asistida 2015. *Regist Soc Española Fertil* 2015;0–48.
122. Sociedad Española de Fertilidad. Registro Nacional de Actividad - Informe estadístico de técnicas de reproducción humana asistida 2019. *Regist Soc Española Fertil* 2019;1–62.
123. Wyns C, Geyter C De, Kupka MS, Motrenko T, Smeenk J, Bergh C, et al. ART in Europe, 2017: results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod Open* 2021;00(0):1–17.
124. Palermo GD, Cohen J, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: A powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil Steril* 1996;65(5):899–908.
125. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Worldwide decline of IVF birth rates and its probable causes. *Hum Reprod Open* 2019;2019(3):1–7.
126. Takeuchi K. Pre-implantation genetic testing: Past, present, future. *Reprod Med Biol* 2021;20(1):27–40.
127. Papas RS, Kutteh WH. Genetic testing for aneuploidy in patients who have had multiple miscarriages: A review of current literature. *Appl Clin Genet* 2021;14(June):321–9.
128. ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica: criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos [Internet]. *Cuad. Embriol. clínica ASEBIR*. 2015 [cited 2021 Jul 31];9–20. Available from: <https://asebir.com/cuadernos-asebir/criterios-asebir-de-valoracion-morfologica-de-oocitos-embriones-tempranos-y-blastocistos-humanos/>
129. Stellwagen NC, Stellwagen E. Effect of the matrix on DNA electrophoretic mobility. *J Chromatogr A* 2009;1216(10):1917–29.
130. Agarwal A, Barbăroşie C, Ambar R, Finelli R. The impact of single- and double-strand DNA breaks in human spermatozoa on assisted reproduction. *Int J Mol Sci* 2020;21(11):1–14.
131. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22(1):174–9.
132. García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl* 2011;34:e546–53.

133. 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;50(4):1–9.
134. Moubasher A, Sayed H, Mosaad E, Mahmoud A, Farag F, Taha EA. Impact of leukocytospermia on sperm dynamic motility parameters, DNA and chromosomal integrity. *Cent Eur J Urol* 2018;71(4):470–5.
135. Boe-Hansen GB, Fortes MRS, Satake N. Morphological defects, sperm DNA integrity, and protamination of bovine spermatozoa. *Andrology* 2018;6(4):627–33.
136. Franco JG, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JBA, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: Implications for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2008;17(1):42–5.
137. Pastuszek E, Kiewisz J, Skowronska P, Liss J, Lukaszuk M, Bruszczyńska A, et al. An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human spermatozoa on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay. *Andrology* 2017;(5):392–8.
138. Aitken R, Bronson R, Smith T, De Luliis G. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod* 2013;19(8):475–85.
139. Cho CL, Agarwal A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab J Urol* 2018;16(1):21–34.
140. Blyth U, Craciunas L, Choudhary M, Hudson G. Maternal germline factors associated with aneuploid pregnancy loss: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2021;00(0):1–19.
141. Xiong X, Dickey RP, Buekens P, Shaffer JG, Pridjian G. Use of Intracytoplasmic Sperm Injection and Birth Outcomes in Women Conceiving through In Vitro Fertilization. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2017;31(2):108–15.
142. Vaughan DA, Sakkas D. Sperm selection methods in the 21st century. *Biol Reprod* 2019;101(6):1076–82.

8. ANEXOS

8.1. Modelos de consentimiento informado

8.1.1. Consentimiento informado en el centro CIMAB

Consentimiento informado para la cesión de datos obtenidos en procedimientos diagnósticos o terapéuticos para destinarlos a la investigación biomédica

Si usted ha entendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiera tener y decide colaborar con la cesión de los datos obtenidos en procedimientos diagnósticos o terapéuticos a CIMAB, SL, en los términos explicados, por favor, lea y firme a continuación.

La persona que firma,

1. Autoriza que la muestra biológica y los datos obtenidos como parte del actual proceso asistencial sean almacenados en CIMAB, SL y utilizados con la finalidad de llevar a término proyectos de investigación biomédica, siempre y cuando estos tengan la obligada aprobación del Comité de Ética en Investigación.

Sí NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable a su salud o la de su familia:

Sí NO

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales:

Sí NO

Sant Quirze del Vallés, a dede 20.....

Nombre y apellidos del paciente:

DNI del paciente:

Teléfono de contacto:

Email de contacto:

Firma del paciente:

8.1.2. Consentimiento informado en el centro UEG

El documento correspondiente al Consentimiento informado del centro UEG, participante en el Proyecto 2 de la presente Tesis Doctoral, se muestra a continuación.



CONSENTIMENT INFORMAT FIV-TE

La parella formada per:

Sra.....major d'edat, amb DNI.....

Sr/Sra.....major d'edat, amb DNI.....

MANIFESTEM:

1. Que se'ns ha explicat que degut a la nostra causa de disfunció reproductiva el tractament adient per tal d'intentar solucionar el nostre problema és la Fecundació *in vitro* i Transferència d'Embrions (FIV-TE).
2. Que hem estat degudament informats mitjançant una visita informativa personalitzada i mitjançant un dossier escrit (Dossier de programa de fecundació *in vitro*) dels passos que es seguiran durant el tractament de FIV, dels aspectes mèdics, biològics, jurídics i ètics relatius a la tècnica esmentada, dels estudis genètics que s'aplicaran, en cas que fossin recomanats pel doctor/a i fos la nostra voluntat, sobre els nostres gàmetes i/o embrions durant aquest tractament (anàlisi preimplantacional dels embrions, estudi de l'ADN dels espermatozoides), dels possibles riscos que poden comportar cadascuna de les tècniques i tractaments, i dels possibles estudis alternatius que es podrien aplicar en cas que volguéssim / fos necessari més informació de caràcter genètic (test de receptivitat endometrial). I se'ns ha explicat les alternatives reproductives que podem tenir.
3. En aquest sentit, que hem estat informats que existeix la possibilitat de realitzar un test genètic per determinar si som portadors de mutacions en gens relacionats amb malalties genètiques heretables recessives que podríem transmetre a la nostra descendència.
 En marcar aquesta opció confirmem que Sí volem realitzar els test de portadors de malalties genètiques recessives. Confirmem que se'ns ha informat de la necessitat d'un assessorament genètic abans i després de realitzar el test per explicar les possibles



implicacions emocionals i mèdiques que el resultat pot provocar sobre nosaltres o els nostres familiars i del cost econòmic que comporta.

OBSERVACIONS(escriure si es vol saber resultats):.....

En marcar aquesta opció confirmem que NO volem realitzar el test de portadors de malalties genètiques recessives i assumim els riscos reproductius que comporta i se'ns ha explicat durant la visita informativa.

Entenen que UEG no està obligat a posar-se en contacte amb nosaltres en el futur quan tinguin noves tècniques de reproducció o proves d'anàlisis genètiques.

4. Ambdós manifestem, de forma lliure i conscient, el nostre consentiment per a sotmetre'ns a les tècniques i estudis mencionats anteriorment.
5. En la consulta mèdica hem declarat que no patim cap malaltia congènita, hereditària o infecciosa transmissible que pugui donar lloc a un risc greu per a la possible descendència.

Riscos personalitzats:.....
.....
.....

6. Entenem que les nostres dades de caràcter personal, inclosos els especialment protegits, formaran part del fitxer de UEG, de conformitat amb el que disposa la Llei Orgànica 15/99 de Protecció de Dades de Caràcter Personal, amb la finalitat de poder oferir-nos un tractament de medicina reproductiva. Els destinataris d'aquesta informació únicament seran els departaments en què s'organitza UEG 12798, S.L. i JOAN CARRERA ROTLLAN (UEG) (Responsable del Fitxer), i els col·laboradors oportuns per a l'acompliment de les seves atribucions i objecte social (que únicament accedeixen a les dades en els termes de l'art. 12 LOPD, sense que això comporti en cap cas una comunicació de les dades), així com la cessió a les entitats oficials públiques i privades que ho exigeixin per Llei. Podem exercir el nostre dret d'accés, rectificació, cancel·lació i oposició, comunicant-ho per escrit a:

La Unitat d'Endocrinologia Ginecològica,



C / Bisbe Torras i Bages nº4 - 08500 Vic

O bé per correu electrònic a l'adreça: info@ueg-reproduccion.com

No desitgem rebre informació sobre UEG12798, S.L. i JOAN CARRERA ROTLLAN (UEG). UEG no envia publicitat, si marqueu aquesta casella no us podrem enviar documentació mèdica per email codificat segons LOPD.

7. Que hem estat degudament informats del marc legal d'aquests procediments que es descriu a la Llei 14/2006 de 26 de maig sobre Tècniques de Reproducció Assistida Humana. En concret:

- Que els preembrions de la FIV que no siguin transferits a l'úter (supernumeraris) o els ovòcits no fertilitzats, es conservaran congelats en el Banc de gàmetes i d'embrions del Laboratori de Reproducció Humana Assistida de la Unitat Endocrinologia Ginecològica durant un període equivalent a la vida fèrtil de la dona. La finalitat de la seva congelació és poder-los transferir o inseminar a la pacient en intents posteriors. Per tant, que el destí que desitjo/desitgem donar als possibles ovòcits i/o preembrions congelats sobrants seria (marcar el que sigui procedent):

- Ús propi, és a dir, utilització per la pròpia parella, dona o, si s'escau, el seu cònjuge femení.

- Donació amb fins reproductius (si la dona és ≤ 35 anys).

- Donació amb fins d'investigació (en base a un projecte degudament presentat i autoritzat per les autoritats sanitàries competents, amb un informe previ favorable de l'òrgan competent i consentiment escrit de la parella o de la dona).

- Cessament de la seva conservació sense altra utilització al finalitzar el termini màxim de conservació (quan la receptora no reuneixi els requisits clínicament adequats per a realitzar la tècnica de reproducció assistida).



- Ens comprometem a anar a la clínica per formalitzar la renovació o canvi de destinació del material criopreservat (ovòcits, espermatozoides o preembrions) i assumir en tot cas el cost econòmic del material criopreservat durant el temps que aquell estigui dipositat al centre.
 - Se'ns ha explicat que si no ens responsabilitzem dels embrions generats mitjançant el pagament de la conservació dels mateixos o signem el destí final dels mateixos un cop ja no tinguem desig reproductiu mitjançant l' ANNEX III PER A LA VARIACIÓ DE LA DESTINACIÓ DELS OÒCITS I/O PREEMBRIONS CRIOPRESERVATS, en un període de 2 anys en el qual el centre haurà enviat dues notificacions d'avertiment, la llei atorga al centre la propietat del material genètic i la capacitat de destinar-lo a altres fins que el centre consideri adequats.
 - Que el consentiment atorgat per l'aplicació d'aquesta tècnica podrà ser revocat en qualsevol moment anterior a la seva realització.
 - Ens comprometem a no iniciar cap cicle de FIV en un altre centre mentre tinguem embrions congelats al Laboratori de Reproducció Humana Assistida de la Unitat Endocrinologia Ginecològica.
 - Que hem estat informats que per tal que els fills nascuts a conseqüència d'aquesta fecundació assistida es considerin fills matrimonials de la persona que conviu amb la mare, d'acord amb la legislació vigent a Catalunya, és aconsellable que el consentiment exprés d'aquesta persona sigui formalitzat en escriptura pública.
8. Segons la llei 9/1998 del 15 de juliol del Codi de família a Catalunya, no és un requisit imprescindible la realització del cicle de FIV-TE. La seva realització queda a criteri de la parella.
9. Estem informats que el risc d'avortament d'un embaràs aconseguit mitjançant FIV-TE sense diagnòstic genètic preimplantacional és similar al d'un embaràs espontani en dones de la mateixa edat.
10. Entenem que l'objectiu de la tècnica és aconseguir la transferència embrionària i, en últim cas, l'embaràs, però el procés de la FIV-TE pot veure's interromput en qualsevol de les seves



fases (desenvolupament fol·licular insuficient, absència d'òocits, absència de fecundació dels òocits, baixa qualitat embrionària...).

11. Que hem estat informats del cost econòmic de l'aplicació d'aquesta tècnica segons pressupost rebut.
12. Que ens comprometem a seguir estrictament les indicacions rebudes per l'Equip Mèdic responsable durant tot el tractament.
13. Entenem que el personal sanitari d'aquest centre resta a la nostra disposició per esclarir o complementar qualsevol aspecte de la informació rebuda.

Per tant,

- Autoritzem a l'equip de la Unitat d'Endocrinologia Ginecològica (UEG) a realitzar la tècnica de Reproducció Assistida anteriorment mencionada.
- Acceptem la realització de la inseminació per ICSI si aquesta és necessària a fi d'augmentar les possibilitats de fecundació dels òocits.
- Acceptem el compromís de responsabilitat sobre els preembrions supernumeraris (els que no es transfereixen) que puguin generar-se durant el procés i que seran congelats, acceptant-los dins del nostre projecte reproductiu.

Volem que es realitzi l'estudi genètic dels nostres embrions i, per tant, autoritzem a UEG a que es realitzin biòpsies als nostres embrions abans de ser transferits, així com a la preparació d'aquestes biòpsies per tal de realitzar els estudis pertinents. Autoritzem a UEG a que es realitzin estudis genètics sobre els nostres embrions per tal d'evitar la transferència d'un embrió amb anomalies cromosòmiques/genètiques.

- No volem que es realitzi cap estudi genètic sobre els nostres embrions.
- Acceptem les limitacions i riscos que aquestes tècniques diagnòstiques tenen i que se'ns han detallat durant la visita informativa.



- Autoritzem a UEG a la utilització de forma anònima d'imatges i dades obtingudes dels nostres gàmetes i/o embrions amb finalitat de divulgació científica, comunicacions, congressos, publicacions, etc (ratlleu si no s'autoritza).
- Hem estat informats que en qualsevol moment podem denegar l'autorització per continuar amb el tractament i/o estudis que es practicaran, i revocar així la nostra decisió de continuar amb el tractament i/o estudis que es faran sobre nosaltres, els nostres gàmetes o embrions.

En marcar aquesta opció reconeixem que hem llegit el full de consentiment complet. Entenem la informació proporcionada i estem d'acord en procedir al tractament i tècniques indicats per l'equip d'UEG.

....., a.....de.....de 20.....

Signatura de la pacient,

Signatura de la parella,

Signatura del ginecòleg,

Signatura de l'embrióleg

ANNEX I PEL MARIT/PARELLA:

D _____, major d'edat, amb que a DNI nº _____ en aquest acte dono el meu consentiment per què en cas que morís abans que el meu material reproductor es trobi en l'úter de la Sra _____, pugui ella, en els 12 mesos següents a la meua mort, procedir a fecundar/transferir amb el mateix, i que es determini la filiació del fill nascut amb mi.

Lloc i data

Signatura parella

Signatura del metge



ANNEX II PER A LA REVOCACIÓ DEL PRESENT CONSENTIMENT

En / Na _____, major d'edat, proveïda de DNI / passaport núm _____ i domicili al carrer / plaça _____ de _____, en aquest acte sol·licito la **SUSPENSIÓ** de l'aplicació de la tècnica de reproducció assistida a la qual m'estic sotmetent.

Lloc i data

Signatura pacient i parella:

Signatura del metge:

ANNEX III PER A LA VARIACIÓ DE LA DESTINACIÓ DELS OÒCITS I/O PREEMBRIONS CRIOPRESERVATS

Sra _____, major d'edat, proveïda de DNI/passaport núm _____ i domicili al carrer/plaça _____ de _____,

D. _____, major d'edat, proveït de DNI / passaport núm _____ i domicili al carrer / plaça _____ de _____,

en aquest acte sol·licitem la modificació de la destinació dels nostres preembrions sobrants / criopreservats i consentim que la nova destinació sigui:

- Utilització per la pròpia dona.
- Donació amb fins reproductius (si la dona és ≤ 35 anys).
- Donació amb fins d'investigació (en base a un projecte degudament presentat i autoritzat per les autoritats sanitàries competents, amb un informe previ favorable de l'òrgan competent i consentiment escrit de la parella o de la dona).
- Cessament de la seva conservació sense altra utilització un cop finalitzat el termini màxim de conservació (quan la receptora no reuneixi els requisits clínicament adequats per a realitzar la tècnica de reproducció assistida).

Lloc i data

Signatura pacient i parella:

Signatura del metge:

8.1.3. Consentimiento informado en el centro GINEFIV

El documento correspondiente al Consentimiento informado del centro Ginefiv, participante en el Proyecto 3 de la presente Tesis Doctoral, se muestra a continuación.

INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO SOBRE RECOGIDA DE DATOS DE CARÁCTER PERSONAL

GINEFIV, S.L., en cumplimiento de lo establecido en el Reglamento General Europeo, 2016/679, de 27 de abril, de Protección de Datos de Carácter Personal, y la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, le informa de que los datos que nos proporcione serán tratados con las siguientes finalidades : la prestación del servicio clínico requerido, el seguimiento y evaluación del paciente, facturación del servicio, control de agenda mediante recordatorios de cita inclusive por medios electrónicos, investigación científica o estadística, así como la realización de encuestas de satisfacción por vía electrónica.

Los datos que obtengamos de Ud., quedarán incorporados en soportes reflejados en un registro de actividades de la entidad que presta servicio en las instalaciones del centro: Clínica Ginefiv, del que es responsable GINEFIV, S.L.

La legitimidad del tratamiento de sus datos se basa en la ejecución de la prestación del servicio sanitario contratado, el consentimiento prestado por el propio paciente, así como en nuestro interés legítimo.

Si la asistencia sanitaria se realizara en base a conciertos con entidades aseguradoras o al amparo de pólizas o coberturas de las que Ud., como paciente, sea beneficiario, se podrán comunicar sus datos, referentes a los servicios prestados con la finalidad de prestar el servicio sanitario y de proceder al cobro de los servicios recibidos. En relación con lo anterior, si su entidad aseguradora o su médico de origen en el caso de pacientes extranjeros, están situados en un país no perteneciente a la Unión Europea, es necesario que usted consienta expresamente a la transferencia internacional de sus datos, con la finalidad anteriormente señalada. También podrán cederse sus datos al Servicio Madrileño de Salud y a otras Administraciones Públicas en los casos previstos legalmente. Asimismo, en aquellos casos en los que, por razón de su tratamiento, sea necesaria la intervención de otros proveedores de servicios asistenciales, como laboratorios para el análisis o diagnóstico, entre otros prestadores de servicios, que precisen de sus datos para este servicio asistencial, podrán cederse o comunicarse a las citadas entidades proveedoras, única y exclusivamente con la finalidad previamente descrita. Por último, sus datos identificativos, laborales, y socioeconómicos, podrán ser cedidos a entidades financieras con el fin de gestionar la solicitud del producto financiero concreto y realizar el estudio y evaluación del riesgo de crédito en el caso de que opte por la financiación de su tratamiento.

Sus datos serán conservados de conformidad con la normativa sanitaria aplicable y cuando ya no sean necesarios para la finalidad para la que son tratados o Ud. así lo requiera, se suprimirán con medidas de seguridad adecuadas que garanticen su seudonimización o la destrucción total.

Si usted se opusiera o estuviera en desacuerdo con estas circunstancias, será necesario que lo ponga en nuestro conocimiento antes de recibir la asistencia sanitaria, por si ésta no fuera posible.

En todo caso, le informamos de sus derechos de acceso, rectificación, supresión, oposición, limitación del tratamiento y portabilidad, que puede ejercitar dirigiéndose por escrito a la sede del Clínica Ginefiv, S.L., sita en Calle José Silva 18, 28043 Madrid o en el correo electrónico dpd@ginefiv.es; también podrá presentar reclamación ante la autoridad de control competente, la Agencia Española de Protección de Datos. Puede usted obtener mayor información sobre estos derechos en nuestra Política de Privacidad, que está a su disposición en nuestras instalaciones y en nuestra página web (www.ginefiv.com).

En virtud de lo expuesto, para realizar el tratamiento de datos descrito, el Responsable del tratamiento necesita su consentimiento explícito o el de su representante legal.

En _____, a ____ de _____ de 20__

Firmado y conforme:

Firmado y conforme:

Los datos que se le solicitan resultan necesarios, de manera que, de no facilitarlos no será posible la prestación del servicio clínico requerido, con excepción del correo electrónico, que tiene carácter voluntario.

Si usted desea que los informes médicos o documentos de análoga naturaleza que nos solicite se le remitan por correo electrónico, por favor indique en el siguiente apartado su dirección de correo electrónico. SOLO SE MANDARAN AQUELLOS RESULTADOS QUE EL PACIENTE SOLICITE EXPRESAMENTE. Y DEBIDAMENTE ENCRIPTADOS.

Datos del/los firmante/s:

D/Da _____,
con domicilio en calle/avda _____
Localidad _____ Provincia _____ C.P. _____
con D.N.I./NIF/NIE _____ Teléfono/s _____ / _____
correo electrónico _____

D/Da _____,
con domicilio en calle/avda _____
Localidad _____ Provincia _____ C.P. _____
con D.N.I./NIF/NIE _____ Teléfono/s _____ / _____
correo electrónico _____

Deseo designar a D/Dña. _____ con DNI _____, para que ejerza de traductor y me represente en todas las comunicaciones orales llevadas a cabo con Ginefiv, S.L.

En su condición de:

Paciente

Representante legal, si procede (pacientes menores de 16 años o legalmente incapacitados). El representante deberá acreditar esta condición, debiendo tener en cuenta el bien del representado. Se solicitará su consentimiento firmado para utilizar estos datos para otros fines.

