



Universidad
de La Laguna

Facultad de Medicina



INFLUENCIA DE LA OXIDACIÓN DEL SEMEN EN EL ÉXITO DE LA FECUNDACIÓN IN VITRO:

**¿ES EFICIENTE LA SISTEMATIZACIÓN DE UN TEST DE
OXIDACIÓN SEMINAL PREVIO AL TRATAMIENTO
REPRODUCTIVO PARA PREDECIR POSIBLES
RESULTADOS DELETÉREOS?**

Trabajo de Fin de Grado

Paula Trujillo Hernández y Alicia Vargas Flores

Tutoras: Dra. Delia Rosa Báez Quintana y Dra. Raquel Blanes Zamora

Unidad de Reproducción Humana. HUC

Curso 2019 / 2020

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS.	17
7. RESULTADOS	21
8. DISCUSIÓN.....	31
9. CONCLUSIONES.....	36
10. AGRADECIMIENTOS.....	37
11. HABILIDADES Y CONOCIMIENTOS ADQUIRIDOS	38
12. BIBLIOGRAFÍA.....	39

RESUMEN

Palabras clave: estrés oxidativo, ROS, espermatozoide, infertilidad masculina, FIV.

Introducción: las especies reactivas de oxígeno (ROS), fisiológicamente presentes en el espermatozoide, pueden alcanzar niveles patológicos y dar lugar a problemas de fertilidad masculina. Por ello, cada vez son más las parejas que recurren a técnicas de reproducción asistida para cumplir su deseo genésico. Sin embargo, una mala calidad del semen desencadenada por el aumento de ROS puede condicionar intentos reiterados sin éxito de dichas técnicas.

Objetivos: comprobar si es eficiente realizar el test *OxiSperm*®, prueba para determinar el nivel de oxidación del semen, de forma rutinaria dentro de los protocolos de estudio del factor masculino en la esterilidad.

Material y métodos: estudio observacional prospectivo sobre muestras seminales de 153 hombres sometidos a un ciclo de FIV/ICSI. Para ello, se establecieron una serie de variables a estudio, entre ellas el nivel de oxidación, hallado con *OxiSperm*®, y los resultados obtenidos se incluyeron en un Excel para su análisis estadístico descriptivo y correlacional.

Resultados y discusión: se observó una tendencia decreciente de los valores de la tasa de embriones útiles, el porcentaje de fertilización y la tasa de embarazo e implantación a medida que aumenta el estrés oxidativo, sin alcanzar la significación estadística (p valor $> 0,05$). Sin embargo, el tamaño muestral reducido del grupo de alta oxidación puede haber influido en los resultados.

Conclusiones: actualmente, no se puede afirmar que *OxiSperm*® deba formar parte de del estudio del factor masculino en la esterilidad de forma rutinaria.

ABSTRACT

Key words: reactive oxygen species, oxidative stress, male infertility, spermatozoa, IVF.

Introduction: reactive oxygen species (ROS) which are physiologically present in the sperm can reach pathological levels and lead to male fertility problems. For this reason, more and more couples are turning to assisted reproduction techniques to reach their desire of pregnancy. However, poor semen quality triggered by increased ROS can condition unsuccessful repeated attempts of the reproductive techniques.

Objectives: to check whether it is efficient to routinely perform the *OxiSperm*® test, a test to determine the level of semen oxidation, within the study's protocols concerning the male factor in sterility.

Methods: prospective observational study on seminal samples of 153 men undergoing an IVF / ICSI cycle. To do this, a series of variables were tested, including the level of oxidation found with *OxiSperm*®, and the results obtained were included in an Excel for descriptive and correlational statistical analysis.

Results and discussion: a decreasing trend was observed in the values of the useful embryo rate, the percentage of fertilization and the rate of pregnancy and implantation as oxidative stress increases, without reaching statistical significance (p value > 0.05). However, the reduced sample size of the high oxidation group may have influenced the results.

Conclusions: nowadays it cannot be affirmed that *OxiSperm*® should take part in the study concerning the male factor in infertility on a routine basis.

INTRODUCCIÓN

La **esterilidad**, definida como la incapacidad para lograr la gestación tras practicar durante un año relaciones sexuales sin protección mínimo dos veces por semana, afecta al 15 % de las parejas en edad reproductiva [1], lo que constituye un problema de salud a nivel mundial. Los factores que influyen son variados, diferenciándose entre factores femeninos y masculinos.

Entre los factores femeninos, se incluyen enfermedades o malformaciones del aparato genital (endometriosis, síndrome del ovario poliquístico, miomas uterinos, etc.), alteraciones cromosómicas, enfermedades autoinmunes, hábitos tóxicos (tabaquismo, alcoholismo, etc.), así como un retraso en la edad de concepción; de hecho, en 2018, un 30% de las madres tuvieron su primer hijo con más de 35 años, siendo la media ese año de 30,6 años [2]. Esta tendencia de retrasar la edad de concepción disminuye en gran medida las posibilidades de embarazo, siendo para las mujeres de 40 años un 50% menos que para las mujeres más jóvenes, y presentando un riesgo duplicado de abortos espontáneos.

En cuanto al factor masculino, este incluye malformaciones genitales, enfermedades autoinmunes, oncológicas, cromosómicas y metabólicas, así como hábitos de vida tóxicos. Se ha observado una mayor prevalencia de infertilidad en pacientes con cáncer de próstata, colorrectal, testicular y melanoma frente a pacientes no oncológicos [3]. Así mismo, se ha demostrado que el consumo de alcohol y el tabaquismo son los principales factores de estilo de vida con un impacto negativo en la fertilidad [4], ya que influyen en la calidad del semen, que constituye un biomarcador crucial para lograr la fecundación. Es de gran importancia controlar el factor masculino, pues está implicado en el 50% de los casos de infertilidad en las parejas [5].

Estos factores, así como los cambios socio-económicos experimentados durante los últimos años, han desencadenado un incremento de la demanda de técnicas de reproducción asistida y ha propiciado la búsqueda de métodos de fertilidad cada vez más óptimos y fiables.

Una vez establecido el diagnóstico de la esterilidad, se plantea la terapéutica, y una de las técnicas más empleadas es la **fecundación in vitro** (FIV), que consiste en la unión del óvulo con el espermatozoide en laboratorio (in vitro) con el fin de producir la fusión de

los núcleos de ambas células sexuales y la integración de la información genética de los mismos, obteniendo así embriones de buena calidad que sean capaces, tras su transferencia al útero materno, de dar lugar a un embarazo viable. Dentro de este procedimiento se puede realizar la denominada microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), recomendada principalmente en los casos de infertilidad masculina (oligozoospermia, problemas de motilidad o morfología espermática, vasectomía, infertilidad de causa inmunitaria, eyaculación retrógrada, entre otros).

La ICSI consiste en la microinyección de un espermatozoide, previamente seleccionado de una muestra de semen o de biopsia testicular, a través de la zona pelúcida y la membrana del ovocito, utilizando un micromanipulador. Tras la obtención de los óvulos por punción folicular, el procedimiento se realiza para cada uno de ellos, siendo un proceso de alta capacitación por parte de los biólogos de la reproducción. Para ello, se introduce el espermatozoide seleccionado dentro de una minúscula pipeta y se inyecta directamente dentro del óvulo. De esta manera, se facilita lo máximo posible la fecundación, permitiendo que los embriones se desarrollen durante 3-5 días en el laboratorio antes de ser transferidos nuevamente al útero materno [6].

Para poder llevar a cabo estas técnicas de reproducción asistida, es fundamental realizar una historia clínica detallada de la pareja, una estimulación hormonal controlada de la mujer, así como el análisis del semen mediante un espermiograma, en el que se realiza un estudio sistemático de variables como la concentración, la motilidad y la morfología de los espermatozoides [7]. Sin embargo, actualmente, el nivel de oxidación del semen no se estudia de forma rutinaria como paso previo al uso del mismo. Las razones están relacionadas principalmente con la disponibilidad, la complejidad y la rentabilidad de las pruebas para determinar el nivel de oxidación seminal y, lo que es más importante, la falta de un protocolo universalmente aceptado. Estas pruebas pueden ser directas, miden el grado de oxidación dentro de la membrana de los espermatozoides, o indirectas, estiman los efectos perjudiciales de la oxidación, como los niveles de peroxidación lipídica o el daño en el ADN [8].

Para poder realizar la **fecundación**, el espermatozoide tiene que atravesar una serie de etapas hasta conseguir unir su núcleo al del ovocito. Lo primero que ocurre en este proceso es la **aproximación**, que consiste en la activación secuencial del espermatozoide para poder iniciar la fecundación. Para ello, el esperamtozoide, en un proceso denominado maduración, aumenta su motilidad y adquiere proteínas que establecen como

célula diana el ovocito. Tras ello, se produce la capacitación, en la que consigue aún más motilidad y aumenta su capacidad de supervivencia, así como un incremento a nivel metabólico del consumo de oxígeno y la glucólisis. Este proceso es crucial, pues solo los espermatozoides capacitados van a poder atravesar las células de la corona radiata que posee el ovocito.

Tras la activación del espermatozoide comienza el proceso de fecundación del ovocito, que se divide en tres fases: penetración de la corona radiata, penetración de la zona pelúcida y fusión de las membranas celulares del ovocito y del espermatozoide.

En la primera fase, la **penetración de la corona radiata**, los espermatozoides capacitados se situarán en la proximidad del ovocito, con el objetivo de fecundarlo. Los cilios que actuaron sobre el espermatozoide también afectarán al ovocito, provocando, junto con el movimiento de las colas espermáticas, el desprendimiento paulatino de las células de la corona radiata.

Tras esto tiene lugar la segunda fase, la **unión a la zona pelúcida** (cubierta de glucoproteínas que envuelve al óvulo, sucesiva a la corona radiata), que genera la entrada de calcio en el espermatozoide, impulsando así la **reacción acrosómica**: el espermatozoide presenta en su cabeza una gran vesícula denominada acrosoma. Al entrar el calcio se produce la fusión de la membrana acrosomal con la membrana celular espermática, provocando así la salida al exterior del contenido acrosomal, constituido por proteínas como la PH30 y enzimas denominadas proteasas y hialuronidasas. Estas enzimas tendrán como función la degradación de la zona pelúcida, permitiendo que la cabeza del espermatozoide entre en contacto con la membrana plasmática del ovocito.

Por último, en la tercera fase, se produce la **fusión de las membranas celulares del ovocito y del espermatozoide**, permitiendo la entrada del espermatozoide en el interior del ovocito (salvo su membrana plasmática, que se quedará en la superficie del ovocito). Esta entrada genera en el ovocito una serie de reacciones:

- Reacción de zona y reacción cortical: para evitar la poliespermia y que solo sea fecundado por un espermatozoide.
- Reanudación de la segunda división meiótica, dando lugar a dos células: una sin casi citoplasma, denominada corpúsculo polar, y otra que será el ovocito

definitivo, que presentará los cromosomas (22 más el X) en un núcleo vesicular denominado **pronúcleo femenino**.

- Activación metabólica.

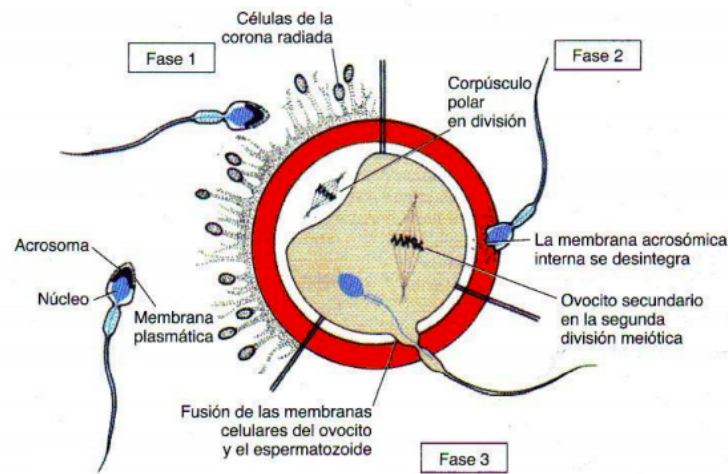


Figura A: se observan las tres fases de penetración del ovocito: fase 1, los espermatozoides atraviesan la corona radiada; en la fase 2, uno o más espermatozoides penetran en la zona pelúcida; en la fase 3, un espermatozoide penetra en la membrana plasmática del ovocito y pierde su propia membrana plasmática. En el ángulo inferior izquierdo se representa un espermatozoide normal con su acrosoma [9].

Por su parte, el espermatozoide se va aproximando al pronúcleo femenino, mientras su núcleo sufre una serie de modificaciones y da lugar al **pronúcleo masculino**. Además, la cola espermática se desprende y se degrada. Los dos pronúcleos, indistinguibles, acaban uniéndose, perdiendo sus membranas nucleares. Seguidamente se suceden una serie de procesos que culminan en la formación de dos células con un número diploide normal de cromosomas y ADN y concluyendo así el proceso de fecundación [9].

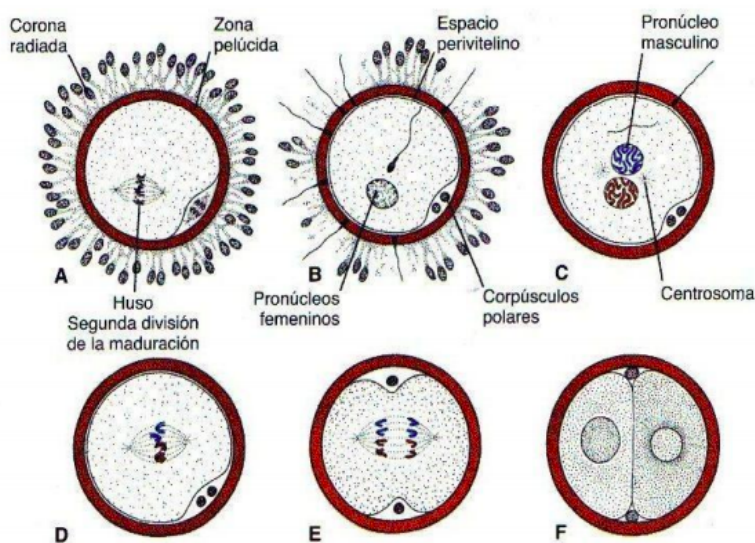


Figura B. Imagen A: ovocito inmediatamente después de la ovulación, en el que puede verse el huso en la segunda división meiótica. Imagen B: un espermatozoide ha penetrado en el ovocito, que ya ha finalizado la segunda división meiótica. Los cromosomas del ovocito se disponen en el pronúcleo femenino. En la zona pelúcida hay adheridas diversas cabezas de espermatozoides. Imagen C: pronúcleos femenino y masculino. Imágenes D, E: los cromosomas se disponen en el huso, se dividen longitudinalmente y se desplazan hacia polos opuestos. Imagen F: fase bicelular [9].

El espermatozoide, para poder llevar a cabo estos procesos y funciones, necesita emplear una alta cantidad de energía que obtiene a través de dos procesos metabólicos: la glucólisis, realizada en la parte principal del flagelo del espermatozoide, y la fosforilación oxidativa, que tiene lugar en las mitocondrias localizadas en la región central del flagelo. Estos procesos producen de forma fisiológica radicales libres, denominados **especies reactivas de oxígeno, “ROS”** (anión superóxido, radicales de hidroxilo, óxido nítrico y peróxido de hidrógeno), que participan en el desarrollo normal de las células y en procesos fundamentales para la fertilización del ovocito, como la maduración del espermatozoide, la capacitación espermática y la reacción acrosómica [8]. Sin embargo, cuando estas especies reactivas de oxígeno superan los niveles fisiológicos y vencen los procesos antioxidantes, generan en el espermatozoide efectos nocivos debido al **estrés oxidativo**.

En condiciones normales, el espermatozoide, tras superar la fase de maduración, presenta en su membrana celular una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que tienen un papel fundamental dentro de los procesos de la fecundación, como la fusión de membranas entre el espermatozoide y el óvulo. Esta alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, hace que el espermatozoide sea muy susceptible a la peroxidación lipídica, una de las principales consecuencias de los altos niveles de ROS.

La **peroxidación lipídica** es una reacción química autocatalítica y autoproliferativa que se inicia gracias a dos reacciones químicas: la reacción Haber-Weiss, donde los iones férricos, por acción de los radicales superóxido, se convierten en iones ferrosos; y la reacción de Fenton, producida consecutivamente, donde el ion ferroso reacciona con peróxido de hidrógeno generando iones férricos nuevamente y radicales hidroxilos [10]. Estos últimos radicales van a interaccionar con los átomos de hidrógeno presentes en los dobles enlaces que forman parte de la composición de los ácidos grasos poliinsaturados, dando como resultado la formación de agua y de un ácido graso radical; este a su vez reacciona rápidamente con el oxígeno molecular, formándose un ácido graso peroxil radical, que seguidamente interaccionará con otro ácido graso poliinsaturado generando un nuevo ácido graso radical y un lípido peróxido, volviendo a repetir este ácido graso radical el proceso comentado previamente. Además, durante estas reacciones se van formando compuestos residuales como el propanol, el hexanol o el malondialdehído, que contribuyen a los efectos nocivos de esta reacción [8]. Como resultado, el espermatozoide podrá perder hasta un 60% de los lípidos de su membrana, llevando esto a una alteración

de su fluidez y permeabilidad, lo que se manifiesta como una disminución notoria de la motilidad espermática, fundamental para la fertilización.

Además de la peroxidación lipídica, los niveles altos de ROS dan lugar a otros eventos como la inducción a la **apoptosis** a través de la citocromo C obtenida de la destrucción mitocondrial, la **reducción de la motilidad** al inhibir la generación de energía debido a mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt), y la **fragmentación del ADN** espermático [8].

Los efectos nocivos de ROS sobre el ADN nuclear de los espermatozoides se manifiestan como un aumento de la fragmentación, la reticulación de la cromatina, las mutaciones en pares de bases y las microdeleciones cromosómicas [8]. La integridad del ADN espermático es esencial para la transmisión precisa de información genética y cualquier forma de daño en este puede provocar infertilidad masculina [11].

Entre las posibles anomalías de ADN en el gameto masculino, la fragmentación del ADN es la más frecuente, especialmente en la población infértil. Un espermatozoide que contiene ADN fragmentado puede estar vivo, móvil, morfológicamente normal y capaz de fertilizar un ovocito. Existen evidencias de que el ovocito puede reparar el daño del ADN dependiendo del tipo de daño de este, así como la calidad y la edad de los ovocitos. Sin embargo, en las técnicas de reproducción asistida, un número importante de pacientes femeninas presentan avanzada edad o una causa de infertilidad ovárica que puede dificultar la capacidad natural de la reparación del ADN [11, 17].

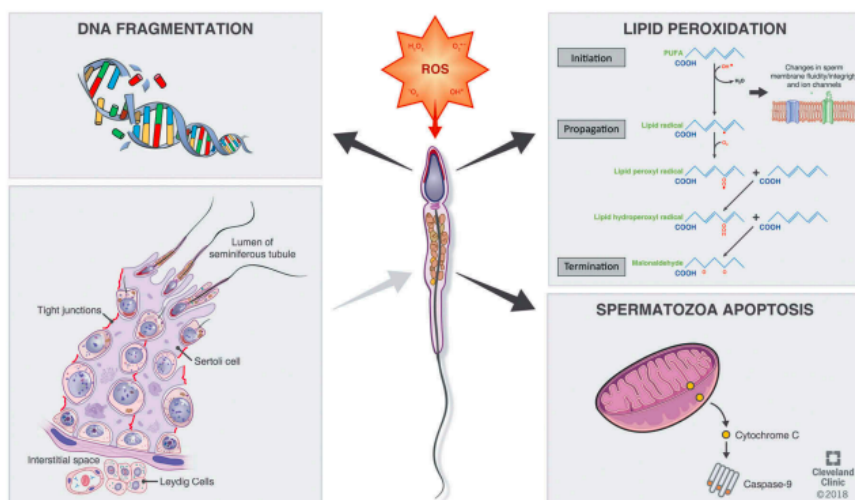


Figura C: consecuencias de ROS en el espermatozoide [8].

La importancia de altos niveles de fragmentación radica en que generan una disminución de las probabilidades de concepción, tanto de forma natural como con técnicas de reproducción asistida, aumentan el riesgo de aborto tras la realización de FIV/ICSI [13], y podrían ser la causa más frecuente de transmisión de anomalías del ADN paterno a la progeñe, especialmente en hombres subfértiles e infértiles [11].

El estrés oxidativo, producto del desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes naturales del cuerpo, es la principal causa de la fragmentación del ADN, pero existen otros factores como el varicocele, la obesidad, la edad avanzada, los tratamientos oncológicos o los hábitos de vida tóxicos que contribuyen en el proceso al aumentar las ROS. Además, dentro de los factores que aumentan las ROS, se diferencian:

Factores pre-eyaculación:

- **Varicocele:** venas escrotales anormalmente dilatadas, presentes en el 15% de la población masculina y aproximadamente el 40% de los hombres infértiles. Pueden causar disminución de la movilidad, concentración y morfología de los espermatozoides, fragmentación del ADN espermático y aumento en la inactivación mitocondrial. Este hecho sugiere que, en los casos de hombres con varicocele, la determinación de la fragmentación del ADN podría ser un factor importante para decidir la opción de tratamiento [11,18]. Sin embargo, a pesar de ser un factor masculino identificable ampliamente aceptado en las parejas infértiles, el beneficio clínico de la cirugía del varicocele para mejorar la fertilidad sigue siendo incierto. No obstante, cada vez existen más estudios que respaldan el beneficio de la varicolectomía en hombres infértiles que presentan varicocele y parámetros anormales del semen [14].
- **Obesidad:** se ha correlacionado con infertilidad masculina y alteración de los parámetros del semen, debido a los desequilibrios hormonales implicados y al estilo de vida asociado (sedentarismo, mala alimentación, entre otros) [14].
- **Diabetes:** existe evidencia actual que señala que esta enfermedad puede generar efectos negativos en las funciones y características espermáticas. No obstante, los estudios al respecto son muy heterogéneos, por lo que es necesario realizar más estudios prospectivos para esclarecer el efecto de la diabetes sobre la calidad seminal [15].

- **Edad:** los pacientes con edad avanzada (> 40 años) presentan una disminución de la calidad del semen, ya que, a mayor edad, mayor acumulación de mutaciones en el genoma nuclear y mitocondrial [12], así como un aumento de la fragmentación del ADN [16].
- **Tratamientos oncológicos:** Radioterapia y quimioterapia [1].
- **Hábitos tóxicos:** se ha demostrado que el consumo de alcohol y el tabaquismo son los principales factores de estilo de vida con un impacto negativo en la fertilidad. La exposición al alcohol y al tabaco, y sobre todo, a este último, produce un aumento la actividad enzimática antioxidante de los espermatozoides que triplica la de los pacientes que no fuman ni beben. Así, enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión reductasa se ven sometidas a una intensa actividad para contrarrestar niveles de oxidación muy elevados. Esta relación oxidación/antioxidante desequilibrada genera a largo plazo un alto estrés oxidativo y, como consecuencia, daño del ADN de los espermatozoides. Por ello, incidir en el abandono del alcohol y, sobre todo, del tabaco, es fundamental para disminuir la carga oxidativa de los espermatozoides [4].
- **Exposición ambiental:** gases como el monóxido de carbono, los óxidos de nitrógeno (originados por el tráfico), el dióxido de azufre (originado de la industria) y materia particulada como el polvo, metales, polen, etc. contribuyen a la contaminación atmosférica y, como consecuencia, a la alteración de la calidad seminal a través de procesos inflamatorios y la producción de estrés oxidativo [1].
- **Ejercicio físico intenso:** altera el balance energético del cuerpo, afectando negativamente al sistema reproductivo. De hecho, el ciclismo realizado durante más de cinco horas semanales está relacionado con una alteración de la movilidad y concentración espermática. Sin embargo, la práctica de actividad física moderada y regular (mínimo tres veces por semana) es beneficiosa para el hombre, ya que contribuye a la mejora de los parámetros de la calidad seminal [1].

Factores post-eyaculación:

- **Leucocitospermia:** alteración espermática caracterizada por la presencia de más de un millón de leucocitos peroxidasa-positivos en el semen, que ante situaciones pro-inflamatorias producen cien veces más ROS que en condiciones normales [8].
- **Espermatozoides inmaduros o con alteraciones morfológicas:** presentan fragmentos de citoplasma que deberían haber desaparecido por completo y confieren la capacidad anómala de producir ROS, aumentando así el estrés oxidativo [10].
- **Alteración de la calidad espermática durante alguno de los procedimientos realizados en las técnicas de reproducción asistida:** como, por ejemplo, una excesiva centrifugación o tiempos prolongados en el desarrollo de la capacitación [11].

Por tanto, todos estos procesos derivados del alto nivel de oxidación provocan una pérdida de la integridad funcional y estructural del semen [12], es decir, generan una disminución en su calidad, que conlleva a una disminución de la capacidad de fertilización y de las probabilidades de una fecundación exitosa a través de técnicas de reproducción asistida.

A pesar de la importancia del nivel de oxidación para la fertilización, todavía no está aceptado de forma generalizada el uso de pruebas que clasifiquen el semen según su nivel de oxidación (como, por ejemplo, el test de oxidación *OxiSperm*®) durante la evaluación del semen del hombre que solicita la realización de una técnica de reproducción asistida ante la imposibilidad de embarazo por vía convencional. Por tanto, la amplia literatura consultada permite definir a los altos niveles de ROS como una causa importante de infertilidad masculina y, como consecuencia, de resultados deletéreos en las técnicas de reproducción asistida.

Una vez identificados los altos niveles de estrés oxidativo, es necesario esclarecer la causa de estos para así poder plantear la mejor estrategia terapéutica. Algunos de los principales tratamientos son:

- **Cambios en el estilo de vida:** minimizar los hábitos tóxicos (como el tabaco o el alcohol) y el estrés tanto profesional como personal, así como seguir un estilo de vida saludable (dieta variada y equilibrada, ejercicio regular, etc.) favorecerá la disminución del estrés oxidativo. Además, es conveniente controlar aquellas

actividades que aumenten la temperatura escrotal, como saunas, baños calientes y largas horas de conducción o sentado en un escritorio, ya que provocan alteraciones en la espermatogénesis que conllevan a un aumento de espermatozoides inmaduros, siendo esto una fuente de producción de ROS [16]. Por tanto, es fundamental mantener una correcta aireación de la zona y una protección adecuada en aquellos trabajos donde haya contacto con sustancias químicas tóxicas que puedan favorecer el estrés oxidativo en el espermatozoide [8].

- **Terapia con antioxidantes:** actualmente existe un auge en la investigación de antioxidantes exógenos como tratamiento para contrarrestar los altos niveles de ROS espermáticos en los hombres infértiles y subfértiles [8]. Se diferencian, por un lado, antioxidantes enzimáticos, como la superóxido dismutasa, la catalasa, las peroxiredoxinas y la glutatión peroxidasa, que se encuentran de forma natural en el semen y, por otro, antioxidantes no enzimáticos, como los ácidos Omega 3, la vitamina C y E, la coenzimaQ10, la L-carnitina y la melatonina, que se pueden adquirir a través de la alimentación o suplementación [1].

Aunque se han publicado estudios que han demostrado efectos beneficiosos del tratamiento con antioxidantes en la mejora de la calidad del semen (aumento de la motilidad, disminución de la fragmentación del ADN, entre otros), existen otros que han obtenido resultados negativos, llegando a cuestionar la utilidad de este tratamiento debido a la poca evidencia clara que respalde su prescripción; incluso, en algunos estudios han observado que este tratamiento puede producir efectos dañinos sobre la salud. La gran mayoría de estos trabajos tienen como problemas fundamentales el poco tamaño muestral empleado, no ser doble-ciego o no dividirse en control-placebo. Además, la variabilidad en los tipos y las dosis de antioxidantes empleados, así como en los diseños de los estudios hace complicado establecer conclusiones sólidas y generales [10,16]. Por tanto, para poder obtener una información más fiable y contundente, es necesario realizar estudios con mayores tamaños muestrales, incluidos grupos de largo control, que permitan observar los efectos del consumo de antioxidantes en los resultados de las técnicas de reproducción [10, 19].

Se deberían realizar experimentos farmacológicos dosis-dependientes para poder establecer la cantidad efectiva de antioxidantes orales, pudiendo ayudar para esto los

niveles de oxidación espermático, ya que su evaluación a lo largo del tiempo podría servir para controlar la respuesta a las terapias antioxidantes y definir la dosis y la duración efectiva del tratamiento [8, 20].

Teniendo en cuenta los tratamientos disponibles, costo-efectivos, sencillos para los pacientes, y en actual investigación para su mejora (como la terapia antioxidante), es fundamental, comprobar si es eficiente la estandarización de la realización de pruebas eficientes que permitan medir los niveles de oxidación del semen (como el test *OxiSperm*®), para así poder ofrecer al paciente el mejor tratamiento posible según las circunstancias individuales. Con ello, se podría obtener una mejoría significativa en la tasa de éxito de las técnicas de reproducción asistida, lo que supondría un ahorro de los recursos y un menor estrés psicológico para la pareja.

JUSTIFICACIÓN

La mala calidad del semen condiciona, entre otros factores, reiterados intentos de FIV/ ICSI sin éxito, que generan malestar y estrés psicológico tanto en el hombre como en la mujer, así como un gasto sanitario a considerar. Para llevar a cabo estas técnicas de reproducción asistida es necesario un análisis exhaustivo tanto de los factores femeninos como los masculinos, siendo estos últimos, en un alto porcentaje de casos, la causa de la imposibilidad de concepción. Para estudiar la fertilidad masculina se realiza principalmente un espermograma, que la clasifica atendiendo a los parámetros obtenidos en el mismo. Sin embargo, en ocasiones el análisis de semen convencional no predice la fertilidad masculina o la probabilidad de embarazo después de un tratamiento de infertilidad [11]. Por ello, con la realización de este proyecto se pretende valorar si el nivel de oxidación del semen, que no forma parte del protocolo de estudio básico del factor masculino en esterilidad, influye negativamente en los resultados de laboratorio de reproducción asistida, y poder así determinar si la realización del test de oxidación seminal *OxiSperm*® es eficiente. Si así fuera, se ahorraría tiempo y recursos, así como la posibilidad de ofrecer a los pacientes un tratamiento destinado a reducir los niveles de oxidación seminal previo a someterse a FIV u otras alternativas posiblemente más exitosas para la concepción.

HIPÓTESIS

A priori, teorizamos que un nivel de oxidación seminal alto influye negativamente en los resultados de las técnicas de reproducción asistida. Teorizamos también que si se tuviera en cuenta el nivel de oxidación del semen previo a su uso en las técnicas de reproducción asistida, se ahorraría tiempo y recursos tanto materiales como asistenciales. Así mismo, planteamos que una intervención sobre los hábitos de vida en el hombre o la instauración de un tratamiento antioxidante individualizado puede mejorar la calidad de su semen.

OBJETIVOS

El objetivo principal de nuestro proyecto consiste en determinar si es eficiente llevar a cabo un test sistematizado de oxidación del semen (*OxiSperm*®) previo a las técnicas de reproducción asistida, y así predecir posibles resultados deletéreos posteriores.

Si se obtiene semen con un nivel de oxidación muy alto que puede influir negativamente en la tasa de embarazo, se podría establecer un plan terapéutico (antioxidantes y/o cambios en el estilo de vida) dirigido a la mejora de la calidad del mismo previo a su uso en reproducción asistida. De esta forma, se trabajaría con semen de mejor calidad (menor nivel de oxidación) y se incrementarían las probabilidades de conseguir un embarazo viable.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se ha realizado un estudio observacional prospectivo sobre la muestra seminal de 153 varones con edades comprendidas entre los 18 y 55 años, con una representación homogénea por grupos de edad, sometidos a un ciclo de fertilización in vitro, y recogida el día de la inseminación de los ovocitos.

Sujetos del estudio

Son sujetos del estudio las parejas que cumplan los criterios de inclusión de la actual cartera de servicios del Sistema Nacional de Salud y cuya indicación terapéutica sea la fertilización in vitro.

Los criterios de selección empleados son:

Criterios de inclusión

1. Varones de edades comprendidas entre 18-55 años.
2. Cumplir criterios de inclusión de las técnicas de reproducción asistida de la sanidad pública (*Decreto 06/2014*).
3. Cumplir criterios de inclusión de FIV-ICSI según cartera de servicios del Sistema Nacional de Salud y de la comunidad autónoma.
4. Recuperación de espermatozoides móviles (REM) >500,000 espermatozoides/ml.
5. Haber firmado consentimiento informado.

Criterios de exclusión

1. No cumplir criterios asistenciales de la sanidad pública.
2. Seminogramas con azoospermia o criptoospermia.
3. Haber ingerido fármacos antioxidantes en los últimos 3 meses.
4. No cumplir los criterios de FIV.
5. No firmar consentimiento informado.

A los pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión se les solicitó el consentimiento informado por escrito para realizar el test.

Criterios previstos para la retirada de los sujetos del estudio

1. Revocar el consentimiento informado.

Variables del estudio

Las variables que se han considerado para este estudio son:

1. **Nivel de oxidación**
2. **Edad del paciente**
3. **IMC del paciente**
4. **Concentración del semen**
5. **Movilidad del semen REM**
6. **Volumen del semen**
7. **FSH y AMH mujer**
8. **Nº de ovocitos extraídos**
9. **Nº de ovocitos maduros**
10. **% ovocitos maduros**
11. **% fertilización**
12. **Nº de fertilizados**
13. **Nº de divididos**
14. **% división**
15. **Nº de embriones de buena calidad**
16. **Nº de embriones transferidos**
17. **Nº de embriones congelados**
18. **Tasa de embriones útiles:** $n^\circ \text{ total de embriones utilizados (congelados + transferidos)} / n^\circ \text{ total de embriones obtenidos}$

Recogida y análisis estadístico de datos

Las variables previamente mencionadas han sido recogidas en *Excel* para su posterior análisis. Se han empleado análisis estadísticos descriptivos y correlacionales (coeficiente de Pearson y χ^2 , entre otros), con el objetivo de determinar si existe relación estadísticamente significativa entre el nivel de oxidación del semen y la viabilidad del embarazo, justificando así el uso sistemático del test de oxidación *OxiSperm®* en la práctica clínica.

Recogida y manejo de muestras

En primer lugar, el paciente aporta al laboratorio de la Unidad de Reproducción Humana del HUC una muestra de semen tras eyacular en las instalaciones del propio servicio.

A continuación, se seleccionan 50 microlitros de esta muestra (previo a la capacitación espermática) para ser analizada, tras la licuefacción, mediante el test de oxidación *OxiSperm*[®], y el resto de semen se emplea para la FIV/ICSI. En caso de excedente de muestra, se destruye.

OxiSperm[®] permite cuantificar los niveles de oxidación del semen empleando un gel reactivo denominado nitro azul tetrazolio (NBT), que presenta la capacidad de convertirse en sal de tetrazolio al contacto con el agua. Cuando este gel se mezcla con el líquido seminal, se convierte, por acción de los aniones superóxido presentes en el mismo, en un cristal azul insoluble conocido como Formazán, que se une a las membranas de los espermatozoides y puede visualizarse fácilmente bajo microscopía de campo brillante. Estos cristales generan en el gel reactivo una intensidad de color creciente (de amarillo a diferentes niveles de azul púrpura) que puede cuantificarse de manera fácil y comparativa a simple vista mediante el uso de una escala de colores. Como alternativa, se puede emplear un colorímetro para medir la absorbancia de longitudes de onda, que varían de 530 nm a 630 nm. La intensidad del color está relacionada con el nivel de estrés oxidativo (exceso de aniones superóxido) en la muestra; mayor oxidación, mayor intensidad del color.

El **protocolo** a seguir para la ejecución de *OxiSperm*[®] es el siguiente:

1. Colocar el gel reactivo en un vaso de precipitado y calentarlo durante 1 minuto en un microondas a máxima potencia o sumergirlo en un baño de agua a 90°C durante aproximadamente 5 minutos.
2. Reducir la temperatura del gel reactivo a 37°C introduciéndolo en un baño de agua u horno a esta temperatura.
3. Mezclar el gel reactivo con la muestra seminal en un tubo *Eppendorf* evitando la formación de burbujas durante el proceso.
4. Gelificar la mezcla a 4°C durante 5 minutos.
5. Incubar la mezcla durante 45 minutos a 37 ° C y comparar el color de la muestra con la escala colorimétrica. Hemos establecido, a raíz de la escala colorimétrica, tres niveles de oxidación:
 - Oxidación **baja**: 1, 1.5 y 2

- Oxidación **moderada**: 2.5 y 3
 - Oxidación **alta**: 3.5 y 4
6. Para obtener los mejores resultados, el test debe realizarse con muestras de semen frescas y justo después de la licuefacción, determinando el estrés oxidativo 60 minutos después de la eyaculación. Se pueden obtener falsos positivos si este tiempo se prolonga.

Es imprescindible mantener una temperatura cercana a 37°C al mezclar la muestra de semen con el gel reactivo, pues de lo contrario la mezcla gelatinizará.

Las **precauciones** a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo *OxiSperm®* son:

1. Todas las muestras de pacientes y reactivos deben ser tratados como potencialmente infecciosos y el usuario debería usar guantes, protección para los ojos y batas de laboratorio.
2. El test debe desecharse en un contenedor de riesgo biológico adecuado una vez finalizado el análisis.
3. No comer, beber ni fumar en el área donde se manejan las muestras y los reactivos.
4. Se recomienda el uso de guantes y mascarilla.

RESULTADOS

Este estudio analiza de manera descriptiva observacional el valor de la oxidación espermática en un total de 153 muestras de semen de pacientes el día de la inseminación de los ovocitos de sus respectivas parejas durante un ciclo de FIV/ICSI.

Características del varón

Se trata de un colectivo de varones de edades comprendidas entre 21 y 54 años, con una media de $38 \pm 5,71$ años. Los niveles de IMC observados fueron amplios, entre 17.3 y 48.15 Kg/ m², con una media de $26.68 \pm 4,14$ Kg/ m².

Características del seminograma

Se realizó, en primer lugar, el espermiograma básico según parámetros de la OMS. La distribución de los resultados obtenidos en nuestra población fue la que se describe a continuación:

Tabla 1. Concentración del semen				
Concentración del semen		Frecuencia (N)	Porcentaje	Porcentaje acumulado
1	Normo	78	51,7	51,7
2	Oligo	34	22,5	74,2
3	Oligoasteno	29	19,2	93,4
4	Asteno	10	6,6	100
Total		151	100	

Para determinar el nivel de oxidación de cada muestra se empleó el test *Oxisperm*®, clasificando los resultados obtenidos en tres grupos: oxidación baja (grupo 1), moderada (grupo 2) y alta (grupo 3). El grupo más numeroso correspondió al de oxidación baja, con un 57,5% del total (88 muestras), seguido del grupo de oxidación moderada con un 35,3% (54 muestras) y finalmente el grupo de alta oxidación con un 7,2 % (11 muestras).

Tabla 2. Nivel de oxidación del semen			
Nivel de oxidación		Frecuencia (N)	Porcentaje
1	Bajo	88	57,5
2	Medio	54	35,3
3	Alto	11	7,2
Total		153	100,0

Características de las parejas femeninas

Las parejas mujeres de los pacientes presentaron una edad media de $35,04 \pm 3,72$ años, máxima de 40 años y mínima de 21 años. La media de la Hormona folículo-estimulante (FSH) empleada para el tratamiento de estimulación ovárica fue 3007, 23 UI, con un mínimo de 96 UI y un máximo de 4900 UI. En cuanto a los niveles de Hormona Antimülleriana (AMH), que determinan la reserva ovárica, el mínimo fue de 0,34 ng/mL y el máximo de 22,20 ng/mL, con una media de $2,37 \pm 2,56$ ng/ml.

La mayoría de las pacientes (64,1%) se sometieron a su primer ciclo de inducción de la ovulación. Para un 24,2 % de ellas era su segundo ciclo y en un 10,5% de los casos era el tercero. Tan solo 2 mujeres sobrepasaron esta cifra, siendo su cuarto y quinto ciclo respectivamente.

En cuanto a la técnica de inseminación empleada, en el 85% de los casos se realizó ICSI, en el 13% FIV y en el 2% mixto (ICSI/FIV).

La transferencia de embriones en el mismo ciclo se llevó a cabo solo en el 56,8% (N=87) de las pacientes de nuestra muestra. El resto fueron criopreservados para su transferencia diferida por diferentes causas. Por ello, solo se constata una tasa de gestación del 16,1%. Sin embargo, este dato sería más objetivo calculando la tasa acumulada de embarazo, que se obtiene sumando la tasa de gestación en fresco y la generada por la transferencia de los embriones congelados, ya que estos fueron obtenidos por la misma muestra seminal.

No existen diferencias entre los tres grupos de oxidación respecto a las variables analizadas en las mujeres. Esto es importante porque homogeniza en la población los factores femeninos para validar los resultados del ciclo a partir de la fertilización, eliminando cualquier desviación de resultados por causa femenina.

La indicación para someterse a reproducción asistida fue mayoritariamente el factor femenino; un 26,1% de las pacientes estaban diagnosticadas de Síndrome de Ovarios Poliquísticos (SOP) y 6,5% de endometriosis, patologías que afectan a la esterilidad. El 35,3% de los casos fueron por indicación mixta, lejos del 9,8% de indicación por factor masculino.

Características del ciclo de reproducción asistida

Este estudio valora las consecuencias que tiene el valor del test de oxidación en el resultado del ciclo de reproducción asistida. Para ello se han recogido las variables que se describen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Características del ciclo de reproducción asistida					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Nº de ovocitos	153	0	33	8,24	5,92
Nº de ovocitos en MII	151	0	33	6,79	5,70
Tasa ovocitos en MII (%)	151	0	100	80,50	25,78
Total de ovocitos fertilizados	153	0	21	5,17	4,27
% de fertilizados	152	0	100	68,23	29,55
Ovocitos divididos	153	0	17	4,67	3,87
% de divididos	141	0	200	96,93	19,57
Emb. de buena calidad	141	0	9	2,65	2,31
% de buena calidad	141	0	100	51,03	31,49
Nº Emb. transferidos	124	0	2	1,42	0,56
Emb. Congelados	140	0	12	2,30	2,62
Tasa de Emb. útiles	140	0	100	70,84	30,16

Como se ve reflejado en la tabla 3, la media de ovocitos obtenidos de las 153 mujeres implicadas en el estudio fue de $8,24 \pm 5,92$. De estos, la media de ovocitos que se encontraban en metafase II (MII) fue de $6,79 \pm 5,70$. El porcentaje medio de ovocitos que fueron fertilizados fue del 68%. Tras dicha fertilización, el mínimo de embriones de buena calidad obtenidos fue de 0 y el máximo de 9, con una media de 2,65 (51%). La media de embriones congelados fue de $2,30 \pm 2,62$, y la de embriones transferidos (en mujeres sin transfer diferido) $1,42 \pm 0,56$.

ANÁLISIS CORRELACIONAL

Se clasificó a los hombres en tres grupos según su nivel de oxidación, siendo:

1. Oxidación **baja**: 1, 1.5 y 2 (*87 pacientes*)
2. Oxidación **moderada**: 2.5 y 3 (*54 pacientes*)
3. Oxidación **alta**: 3.5 y 4 (*11 pacientes*)

Cada grupo se correlacionó con los siguientes parámetros:

Edad del paciente

Se agrupó en 3 intervalos: 20 - 30 años (*Rango 1*); 31 - 40 años (*Rango 2*) y > 40 años (*Rango 3*). Al correlacionar la edad del paciente con el nivel de oxidación, se observó que los pacientes más jóvenes presentaban un nivel de oxidación superior al de los pacientes más añosos, grupos 2 y 3 (*18,2% frente a 8,5% y 2,1% respectivamente*). Tras correlacionar ambas variables mediante el coeficiente de correlación de Pearson, se obtuvo como resultado -0,186, con un p valor <0,05, es decir, que existe una ligera relación negativa entre las variables; a menor edad, mayor nivel de oxidación seminal.

Tabla 4. Edad / Nivel de oxidación						
			NIVEL DE OX			Total
			1	2	3	
RANGO DE EDAD	1	Recuento	4	5	2	11
		% dentro de rango de edad	36,4%	45,5%	18,2%	100%
	2	Recuento	52	34	8	94
		% dentro de rango de edad	55,3%	36,2%	8,5%	100%
	3	Recuento	31	15	1	47
		% dentro de rango de edad	66,0%	31,9%	2,1%	100%
Total		Recuento	87	54	11	152
		% dentro de rango de edad	57,2%	35,5%	7,2%	100%

IMC del paciente

La obesidad constituye un factor de riesgo oxidativo seminal; por ello, se han correlacionado ambas variables. Para ello, se clasificaron a los pacientes en función de su IMC, formando 3 grupos: 1. Normopeso (18,5 - 24,9 Kg/ m²), 2. Sobrepeso (25 - 29,9 Kg/ m²); 3. Obesidad (> 30 Kg/ m²). La relación entre el IMC del varón y el nivel de oxidación se expone en esta tabla:

Tabla 5. IMC / Nivel de oxidación						
			NIVEL DE OX			
			1	2	3	
GRUPO SEGÚN IMC	1	Recuento	29	17	5	51
		% dentro de Grupo IMC	56,9%	33,3%	9,8%	100%
	2	Recuento	41	22	5	68
		% dentro de Grupo IMC	60,3%	32,4%	7,4%	100%
	3	Recuento	13	12	0	25
		% dentro de Grupo IMC	52,0%	48,0%	0,0%	100%
Total		Recuento	83	52	10	145
		% dentro de Grupo IMC	57,2%	35,9%	6,9%	100%

Como se observa, en los tres grupos según IMC el nivel de oxidación predominante es el 1, es decir, oxidación baja. Destaca además que ninguno de los varones incluidos en el grupo 3 (IMC > 30) presenta un nivel 3 de oxidación. Tras la realización de las pruebas de χ^2 y el test del coeficiente de correlación de Pearson, se han obtenido en ambas un valor no significativo ($p < 0,05$), es decir, que estadísticamente no hay una relación significativa entre la obesidad y un nivel elevado de oxidación.

Tipo de muestra seminal y nivel de oxidación

Estos datos se pueden visualizar en la siguiente tabla 6. Llama la atención que ninguno de los pacientes cuya muestra fue diagnosticada como astenozoospermia presenta un nivel de oxidación 3 (alto).

		Tabla 6. Concentración del semen / Nivel de oxidación					
		NIVEL DE OX			Total		
		1	2	3			
CONCENTRACIÓN SEMEN	1	Normo	Recuento	48	24	6	78
			% dentro de []	61,5%	30,8%	7,7%	100%
	2	Oligo	Recuento	15	16	3	34
			% dentro de []	44,1%	47,1%	8,8%	100%
	3	Oligoasteno	Recuento	17	10	2	29
			% dentro de []	58,6%	34,5%	6,9%	100%
	4	Asteno	Recuento	7	3	0	10
			% dentro de []	70,0%	30,0%	0,0%	100%
Total		Recuento	87	53	11	151	
		% dentro de []	57,6%	35,1%	7,3%	100%	

Para profundizar en el análisis, se agruparon las muestras en dos grupos: normales y patológicas, incluyendo en este último todos los diagnósticos anormales según los criterios de la OMS del 2010; es decir, se estableció una comparativa entre espermiogramas normales (normozoospermia) versus patológicos (oligo, oligoasteno y astenozoospermia). Además, se estudió la influencia de la movilidad o el recuento sobre la oxidación, comparando: espermiogramas normo versus oligo (< 15 mill/cc) y normo versus asteno (< 32% de la movilidad progresiva). Los resultados se muestran en las siguientes tablas (7, 8 y 9):

Tabla 7. Categoría semen / Nivel de oxidación					
			NIVEL DE OX		
			1	2	3
CATEGORÍA SEMEN	Normo	Recuento	48	24	6
		% dentro de grupo de Ox	55,2%	45,3%	54,5%
	Patológico	Recuento	39	29	5
		% dentro de grupo de Ox	44,8%	54,7%	45,5%
Total		Recuento	87	53	11
		% dentro de grupo de Ox	100%	100%	100%

Tabla 8. Concentración del semen / Nivel de oxidación					
			NIVEL DE OX		
			1	2	3
CONCENTRACIÓN SEMEN	Normozoospermia	Recuento	48	24	6
		% dentro de Concentración	61,5%	30,8%	7,7%
	Oligozoospermia	Recuento	15	16	3
		% dentro de Concentración	44,1%	47,1%	8,8%
Total		Recuento	63	40	9
		% dentro de Concentración	56,3%	35,7%	8,0%

Tabla 9. Movilidad / Nivel de oxidación					
			NIVEL DE OX		
			1	2	3
CONCENTRACIÓN SEMEN	Normozoospermia	Recuento	48	24	6
		% dentro de Concentración	61,5%	30,8%	7,7%
	Astenoospermia	Recuento	7	3	0
		% dentro de Concentración	70,0%	30,0%	0%
Total		Recuento	55	27	6
		% dentro de Concentración	62,5%	30,7%	6,8%

No se observó relación entre el nivel de oxidación y las variables del seminograma recuento y movilidad.

Movilidad del semen REM y Volumen del semen

En cuanto a la movilidad del semen REM y el volumen del semen, se realizó el test de correlación de Pearson, obteniéndose unos p valor de 0,504 y 0,424 respectivamente, por lo que la relación de cada uno de ellos con el nivel de oxidación no es estadísticamente significativa.

Porcentaje de fertilización

El primer paso que valora la capacidad funcional de un espermatozoide es la fertilización ovocitaria; uno de los objetivos planteados en este estudio es comprobar si la oxidación seminal afecta dicha fertilización, y por ello se ha analizado su correlación. Los resultados se exponen en la Tabla 10.

Tabla 10. Nivel de oxidación / Tasa de fertilización	
	% FERT (X ± DS)
NIVEL DE OX	
1	70,54 ± 28,03
2	68,37 ± 29,18
3	49,32 ± 38,42
Total	68,23 ± 29,55

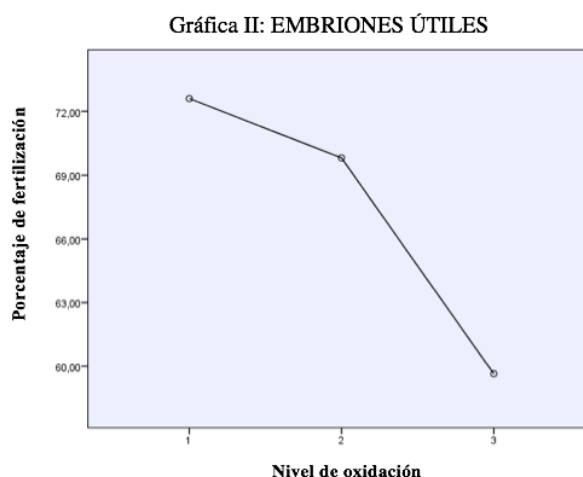
Se observa menor tasa de fertilización en el grupo 3 de oxidación (49,32 ± 38,42%) y los sémenes poco oxidados presentan una tasa de fertilización mayor (70,54 ± 28,03%), el coeficiente de correlación de Pearson, de -0,86, demuestra una ligera relación negativa entre las variables, como expresa la gráfica I; sin embargo, no alcanzó la significación estadística (p valor de 0,293).



Tasa de embriones útiles

El fin de la FIV/ICSI es la génesis de embriones de calidad para la transferencia en fresco y la criopreservación, siendo esto lo denominado como “embriones útiles”; en síntesis, la suma de los embriones transferidos más los embriones congelados. El grupo 3 de oxidación es el que presenta la menor tasa de embriones útiles, (59,65 ± 22,92%), en contraste con el grupo 1, que presenta la mayor tasa (72,60 ± 29,81%). El coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables, (-0,107), implica una relación negativa entre ellas, pero con un p valor > 0,05 (0,209), que no es estadísticamente significativa. Esto se expone en la siguiente tabla 11 y gráfica II.

Tabla 11. Nivel de oxidación / Tasa de embriones útiles	
	TASA DE EMBRIONES ÚTILES (X ± DS)
NIVEL DE OX	
1	72,60 ± 29,81
2	69,81 ± 31,75
3	59,65 ± 22,92
Total	70,84 ± 30,16



Indicadores de calidad ASEBIR

Como se ha comentado, tanto el **porcentaje de fertilización** como la **tasa de embriones útiles** no han obtenido significación estadística. Sin embargo, su relación con los distintos niveles de oxidación también puede analizarse siguiendo los indicadores de calidad establecidos por ASEBIR (*Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción*) para estos parámetros, recogidos en el libro “*Cuadernos de embriología clínica*”, avalado por ASES (Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva) [22].

Los indicadores de calidad ASEBIR describen la actividad realizada en términos cuantitativos o cualitativos, contribuyendo a evaluar la metodología empleada por parte de los laboratorios de reproducción asistida. Para ello se establecen 3 niveles: óptimo, deseable y mínimo [22]. Entonces, para **porcentaje de fertilización** y **tasa de embriones útiles** establecen:

Tabla 12. Indicadores de calidad ASEBIR [22]			
	ÓPTIMO	DESEABLE	MÍNIMO
% DE FERTILIZACIÓN	73,5 (70,2 - 79,2)	73,5 (70,2 - 79,2)	58,1 (56,7 - 59,5)
% DE EMBRIONES ÚTILES	70,8 (66,0 - 90,1)	56,5 (54,8 - 58,3)	47,9 (45,4 - 50,4)

En cuanto al **porcentaje de fertilización**, los resultados que se obtuvieron para los tres grupos de oxidación fueron:

- **Grupo 1:** 70,54% (Nivel óptimo)
- **Grupo 2:** 68,36% (Nivel deseable)
- **Grupo 3:** 49,32% (Nivel mínimo)

En cuanto a la **tasa de embriones útiles** o rendimiento, los resultados para cada grupo fueron:

- **Oxidación 1:** 72,6% (Nivel óptimo)
- **Oxidación 2:** 69,81% (Nivel óptimo)
- **Oxidación 3:** 59,65 (Nivel deseable)

Porcentaje de embriones de buena calidad

Como se expone en la tabla 14, no existen grandes diferencias entre los porcentajes de buena calidad embrionaria según los grupos de oxidación; destacar que el grupo 1 es el que presenta un mayor porcentaje de embriones de buena calidad, con una media del 54,46%. P valor > 0, 05.

Tabla 13. Nivel de oxidación/Embriones de buena calidad	
	% EMBRIONES DE BUENA CALIDAD (X±DS)
NIVEL DE OX	
1	54,46 ± 30,58
2	46,47 ± 33,70
3	44,94 ± 23,78
Total	51,03 ± 31,49

El porcentaje de embriones de buena calidad disminuye a medida que aumenta el nivel de oxidación. Sin embargo, esta relación no es significativa. Si se realizara el estudio con una N superior, el grado de significación podría ser diferente.

Tasa de embarazo y tasa de implantación

Tanto la tasa de embarazo como de implantación no experimentan cambios significativos entre los distintos grupos 1 y 2 de oxidación salvo en el grupo 3, donde el porcentaje en ambos casos es del 0%; es decir, no se produjo ninguna implantación adecuada ni se obtuvo ningún embarazo en el grupo de alta oxidación. Estos datos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 14. Nivel de oxidación / Tasa de embarazo e implantación			
		TASA DE EMBARAZO	TASA DE IMPLANTACIÓN
NIVEL DE OX	N		
1	50	16%	11%
2	33	18,2%	16%
3	4	0%	0%

Esto podría dar lugar a la interpretación de que existe cierta tendencia a obtener peores resultados cuando el nivel de oxidación es alto. Sin embargo, tras la realización de la prueba de igualdad de Levene de varianzas de error, se llegó a la conclusión de que no existen diferencias significativas entre los tres niveles de oxidación y la tasa tanto de embarazo como de implantación.

Destacar que estos datos se obtuvieron solo de las pacientes sometidas a una transferencia de embriones en fresco (N=87), mientras que el resto presentaron transferencia diferida. Por tanto, esta variable debería sustituirse por la “tasa acumulada de embarazo”, que se obtiene sumando la gestación de las transferencias en fresco y la que se lograría con las transferencias de los ciclos de embriones congelados que se generaron con la misma muestra seminal. Dado que en el momento de la realización del estudio las pacientes no habían descongelado sus embriones, no se ha podido llevar a cabo, pero es una idea para desarrollar en el futuro.

DISCUSIÓN

Por su alta prevalencia, la infertilidad representa hoy en día un problema clínico relevante y, actualmente, el papel del estrés oxidativo en su etiología está cada vez más aceptado. Los espermatozoides, al ser ricos en ácidos grasos poliinsaturados, son vulnerables al daño oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS). En condiciones normales, el balance entre la producción de ROS y la actividad antioxidante está mantenido. Sin embargo, niveles excesivos de ROS pueden afectar negativamente a la calidad espermática debido a su implicación en la fragmentación del ADN, la peroxidación lipídica y la apoptosis celular, produciendo alteraciones en la concentración, movilidad y morfología espermática, lo que genera en el varón que sus probabilidades de infertilidad se incrementen; de hecho, se han descrito concentraciones elevadas de ROS en el 30-80% de hombres infértiles. Estas cifras, sumado a que en un 25% de los casos el factor masculino es la única causa de infertilidad en la pareja, ha propiciado la realización de este estudio para poder abordar con mayor profundidad la repercusión del nivel de oxidación en los distintos parámetros que se valoran en las técnicas de reproducción asistida [1,21].

En cuanto a los parámetros del **seminograma**, se observó que no existen diferencias significativas entre los distintos niveles de oxidación y la concentración y movilidad espermática, e incluso ningún paciente con astenozoospermia presentó un nivel alto de oxidación. Sin embargo, existen numerosos estudios que explican el efecto apoptótico del estrés oxidativo en los espermatozoides maduros, provocando la disrupción de sus membranas mitocondriales y alterando la actividad de las caspasas inductoras de la apoptosis, lo que explicaría que pacientes con niveles de oxidación elevados presenten más probabilidades de padecer oligozoospermia. Además, como la apoptosis espermática controla la producción de gametos masculinos, si esta se altera provocaría la persistencia de espermatozoides anormales que estaban marcados para ser destruidos, aumentando esto la astenozoospermia [1]. Los resultados obtenidos pueden estar condicionados por el tamaño muestral del grupo 3 de oxidación, muy reducido (N=11), por lo que la realización de otro estudio con una muestra mayor podría aportar datos más concordantes con la bibliografía consultada. No obstante, existen estudios que concluyen que no puede establecerse una relación entre el aumento de ROS y la movilidad espermática [1], por lo que sería conveniente realizar más investigaciones sobre esta correlación.

Otro de los factores que se relaciona con el nivel de oxidación seminal es la **edad**. En la bibliografía consultada se expone que los pacientes con edad avanzada (> 40 años) presentan una disminución de la calidad del semen, pues, a mayor edad, mayor acumulación de mutaciones en el genoma nuclear y mitocondrial [11,17], así como un aumento de la fragmentación del ADN [13]; sin embargo, en este estudio, los pacientes más añosos no presentaron niveles de oxidación superiores a los de los jóvenes, todo lo contrario. Se observó una ligera relación inversa entre las variables; a menor edad, mayor nivel de oxidación seminal. Entre las posibles causas que pudieron haber favorecido este hecho destacan:

- Número de pacientes que constituye el grupo de oxidación alta, que es muy reducido (N=11) y, por tanto, la muestra no es significativa ni extrapolable a la población general.
- Resultados debido al azar como consecuencia de una N no representativa.
- Posibles hábitos de vida en los pacientes jóvenes que favorecen la producción de ROS: tabaco, marihuana, alcohol, ejercicio físico intenso, consumo de anabolizantes entre otros.
- Presencia de patologías que favorecen el estrés oxidativo: diabetes, varicocele, cáncer.

La **obesidad** se ha relacionado con una alteración en la espermatogénesis y en la función espermática, generando efectos dañinos como la fragmentación del ADN [10]. De hecho, se han realizado estudios sobre su efecto en la cromatina del núcleo espermático. Un nivel alto de IMC favorece la producción de niveles patológicos de ROS, lo que incrementa a su vez la fragmentación del ADN, que se manifiesta clínicamente como una disminución en la capacidad de fecundación del espermatozoide, un incremento en las tasas de aborto, una afectación del desarrollo embrionario y en posibles complicaciones en el recién nacido [1]. Dado el impacto negativo que podría tener la obesidad en las técnicas de reproducción asistida, se ha querido estudiar su relación con el nivel de oxidación y así comprobar si es significativo, para poder actuar sobre ella y mejorar así los niveles de oxidación. Sin embargo, en este trabajo, ninguno de los varones incluidos en el grupo 3 (IMC > 30, obesidad) han presentado semen con oxidación alta (nivel 3). Una de las principales limitaciones de este estudio ha sido que la muestra que constituye el grupo 3 (IMC < 30, obesidad) es muy reducida (N= 25). Posiblemente, ampliando el tamaño muestral en una segunda fase, se podrían obtener datos más esclarecedores.

En cuanto al **Porcentaje de fertilización** y la **Tasa de embriones útiles**, a pesar de no haberse relacionado de forma estadísticamente significativa (p valor $> 0,05$) con el nivel de oxidación, al analizar los resultados en base a los indicadores de calidad establecidos por ASEBIR, se observó que en ambos parámetros un nivel de oxidación bajo se relaciona con niveles óptimos de calidad. Por tanto, aunque no sea significativo a nivel estadístico, es conveniente presentar niveles bajos de oxidación, pues a nivel biológico sí que se obtienen resultados peores en estos parámetros a medida que aumenta el estrés oxidativo. Esto puede ser debido a los efectos nocivos de la oxidación, entre los que destaca la fragmentación del ADN espermático, relacionado con la disminución de la capacidad de fecundación del espermatozoide y la alteración en el desarrollo embrionario. No obstante, nuevamente, podría ser beneficioso la realización de estudios con un mayor tamaño muestral, para así comprobar si se podría obtener una significación estadística.

Con respecto a la **Tasa de embarazo e implantación**, tampoco fue estadísticamente significativa su relación con los distintos niveles de oxidación, pero aun así se observó una disminución notable en el porcentaje de estos parámetros en el nivel de alta oxidación (3), presentando un porcentaje del 0% en ambas tasas. Por lo tanto, niveles elevados de estrés oxidativo parecen tener relación con el éxito de las técnicas de reproducción asistida. Las alteraciones en el espermatozoide le impiden el desarrollo óptimo de sus funciones, entre las que se incluyen procesos de gran importancia como la unión a la zona pelúcida del ovocito y la fusión espermatozoide-ovocito, lo que dificulta una correcta fecundación, disminuyendo así las probabilidades de implantación y de desarrollo del embarazo [22]. Destacar que los resultados se obtuvieron de un porcentaje reducido de mujeres, ya que en el 37,9% de los casos se realizó una transferencia de embriones diferida, por lo que no fue posible obtener los datos de estos parámetros en dichos casos. Estudios donde se incluya un mayor tamaño muestral y donde el porcentaje de transferencias diferidas sea menor podría aportar datos más reveladores y que alcanzaran la significación estadística. Por otro lado, podrían sustituirse en otros trabajos la tasa de embarazo e implantación por la tasa de acumulación del embarazo, comentada con anterioridad, ya que esta incluye, además de los embarazos obtenidos por transferencia de embriones en fresco, los obtenidos con embriones congelados transferidos con posterioridad, obtenidos ambos de la misma muestra seminal, consiguiendo así un análisis más completo. Por ello, es necesario seguir investigando sobre la relación del nivel de

oxidación y la tasa de embarazo, ya que supone el objetivo final de las técnicas de reproducción y de las parejas que las solicitan.

Como se observa, en ningún parámetro se ha obtenido un resultado significativo a nivel estadístico en su relación con los niveles de oxidación. Sin embargo, uno de los principales efectos que genera el estrés oxidativo y que también podría alterar las variables incluidas en el ciclo de reproducción asistida es la fragmentación del ADN. La integridad del ADN espermático es crucial para una transmisión adecuada de la información genética, lo que implica que cualquier daño en este puede conllevar a infertilidad masculina, malos resultados tras la realización de técnicas de reproducción asistida y un aumento de las pérdidas de embarazo. Dentro de las distintas causas que lo generan se encuentran parámetros estudiados en este trabajo, como es la obesidad y la edad, pero existen muchas otras, como la exposición ambiental a agentes tóxicos, el tratamiento con radiación ionizante, el calor, etc. [11]. Por tanto, la fragmentación del ADN cada vez está cobrando mayor importancia dentro del estudio de los factores masculinos implicados en la esterilidad. Se podría plantear la realización de futuros trabajos enfocados a la correlación de las variables estudiadas con la fragmentación del ADN, para así poder indagar más en su impacto dentro de las técnicas de reproducción asistida y comprobar si es eficiente su estudio previo al inicio de dichas técnicas.

La generación de ROS y los mecanismos de daño espermático están cada vez más claros, ofreciendo nuevas posibilidades de tratamiento empírico. Se han publicado múltiples estudios atendiendo al potencial beneficio del **tratamiento antioxidante** sobre la calidad espermática, sin embargo, las recomendaciones sobre su uso aún no son consistentes [1]. El semen presenta mecanismos enzimáticos antioxidantes que actúan sobre el metabolismo directo de ROS, la síntesis y reducción del Glutatión y los ciclos redox de Tiol, entre otros, y están regulados mediante el factor de transcripción nuclear NRF2 y los elementos de respuesta antioxidante localizados en los promotores de algunos de los principales genes del sistema antioxidante del semen. Entre estas enzimas se encuentran la superóxidodismutasa, la catalasa, la glutatión S-transferasa, las peroxiredoxinas, las tioredoxinas y la glutatiónperoxidasa. Además, existen moléculas no enzimáticas que presentan acción antioxidante y se encuentran de forma natural en el semen, como la vitamina E y C, la CoEnzima Q10, la L-carnitina y la Melatonina [23]. Sin embargo, en ocasiones estos mecanismos de defensa contra el daño oxidativo no son suficientes y se produce un desequilibrio a favor de ROS. Según algunos autores entre el 30 y el 80% de

los casos de infertilidad masculina son debidos al daño producido por estrés oxidativo sobre el espermatozoide, por ello la terapia antioxidante constituye una línea de investigación de gran interés en la medicina reproductiva. Entre las moléculas más estudiadas destacan el ácido docosahexanoico, la coenzima Q10, las vitaminas C y E, el zinc y el selenio, que son capaces de contrarrestar los efectos de las ROS y mejorar la concentración, motilidad y morfología espermática. Teniendo en cuenta la cinética de la espermatogénesis, se ha establecido que el tratamiento debe durar al menos 3 meses para objetivar algún cambio en los parámetros seminales, existiendo controversia actualmente sobre si tratamientos más prologados son más beneficiosos [1, 21]. Por ello, es un campo que todavía necesita de la investigación y desarrollo para concretar la efectividad de planes terapéuticos cuya dosis y duración sean precisas, para así disponer de un tratamiento sencillo y no invasivo para los pacientes con niveles altos de oxidación, mejorando con ellos los resultados reproductivos.

CONCLUSIONES

1. El nivel de oxidación es independiente de las variables del seminograma, es decir, un semen catalogado como normal puede presentar niveles altos de oxidación.
2. En esta serie, la edad no se correlaciona directamente con el nivel de oxidación, pero se observa ligera relación negativa entre ambas variables.
3. El IMC se correlaciona, paradójicamente, de forma contraria a lo esperado, probablemente por una N muy reducida en el grupo de obesos, que podrían ser subsidiarios de estudio de la fragmentación del ADN.
4. Existe cierta tendencia a la disminución del porcentaje de ovocitos fertilizados y tasa de embriones útiles a medida que aumenta el nivel de oxidación espermático, aunque no es estadísticamente significativo.
5. La tasa de embarazo e implantación no presentan una relación estadísticamente significativa con el nivel de oxidación, a pesar de que se observe una disminución notable cuando el nivel de oxidación es alto. Sería conveniente hallar en una segunda fase del estudio la tasa acumulada de embarazo.
6. Todos los parámetros analizados se han visto condicionados por un tamaño muestral reducido del grupo 3 de oxidación (N=11).
7. El nivel de oxidación no aporta resultados contundentes sobre su efecto en las variables analizadas, por lo que podría ser interesante realizar una segunda fase del estudio donde se analice su relación con la fragmentación del ADN.
8. A pesar del efecto negativo de ROS sobre el espermatozoide, sigue habiendo controversia sobre el efecto de los niveles elevados de ROS sobre los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA).
9. A día de hoy, no se puede afirmar que sea eficiente realizar un test sistematizado para determinar la oxidación del semen a todo varón que se someta a técnicas de reproducción asistida sin tener estos puntos mencionados clarificados.
10. Sin embargo, si así fuera, el test *OxiSperm*[®] constituiría un método no invasivo, sencillo, rápido y económico para determinar el nivel de oxidación del semen y orientar así sobre su calidad y las probabilidades de obtener resultados exitosos en las técnicas de reproducción asistida.

AGRADECIMIENTOS

A nuestras tutoras, la Dra. Delia Rosa Báez Quintana y la Dra. Raquel Blanes Zamora, por su dedicación, su inmediatez en la solución de dudas y cuestiones, por permitirnos desarrollar nuestras habilidades y conocimientos de una manera abierta y pedagógica, acompañándonos y ayudándonos en todo momento, pero siempre dejándonos marcar el camino a nosotras, sin imponer, y manteniendo el buen humor en el equipo durante todo el desarrollo del presente trabajo.

A Stephany Hess Medler, por dedicarnos parte de su tiempo y ayudarnos a realizar el análisis estadístico de los datos.

HABILIDADES Y CONOCIMIENTOS ADQUIRIDOS

- Nos ha permitido interiorizar y aprender a aplicar aquellos conocimientos y habilidades relacionadas con el método científico y la estadística, que en algún momento del grado nuestros profesores intentaron transmitirnos. Entre ellas destacan:
 - El desarrollo y mejora de las habilidades necesarias para manejar un documento Excel, adquiriendo destreza y soltura para trabajar en dicho recurso con los datos obtenidos.
 - Realizar una mejor búsqueda bibliográfica, aprendiendo y obteniendo un mayor conocimiento sobre las páginas principales para este fin (PubMed, Cochrane, entre otros), así como una mayor destreza para distinguir y seleccionar los mejores artículos científicos relacionados con nuestro trabajo de fin de grado.
- Hemos aprendido sobre los protocolos establecidos y los diversos procedimientos que se realizan en la Unidad de Reproducción Humana del HUC (FIV, ICSI, TEC, entre otros), así como las técnicas empleadas para llevarlos a cabo. Además, desde un punto de vista teórico, hemos profundizado en los procesos fisiológicos y bioquímicos implicados en la reproducción humana.
- Hemos trabajado en equipo, integrando las ideas de cada una e intentando realizar un TFG enriquecedor y satisfactorio, formando un tándem muy coordinado y compenetrado.
- Por último, hemos disfrutado del trabajo bien hecho, sintiéndonos muy satisfechas con el esfuerzo realizado y el resultado obtenido; a pesar de los momentos de flaqueza e incertidumbre, no hemos desistido y hemos conseguido presentar un trabajo del que nos sentimos seguras y orgullosas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amorós Prats D, Atienza de Nava S, de la Casa Heras M, et al. *Cuadernos de Andrología Clínica: Contaminación ambiental y manejo del estrés oxidativo en el factor masculino (ASEBIR)*. 1st ed. Madrid: Góbalor, Agencia Creativa Digital; 2017.
2. INE. 2020. Edad media a la maternidad por orden del nacimiento según nacionalidad (española/ extranjera) de la madre.
3. Agarwal A, Roychoudhury S, Bjugstad K, Cho C. *Oxidation reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility?* Therapeutic Advances in Urology [Internet]. 2016;4-10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27695529>
4. Aboulmaouhib S, Madkour A, Kaarouch I, et al. *Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage*. First International Journey of Andrology: Andrología [Internet]. 2017;3-4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29164649>
5. Majzoub A, Arafa M, El Ansari W, et al. *Correlation of oxidation reduction potential and total motile sperm count: its utility in the evaluation of male fertility potential*. Asian Journal of Andrology [Internet]. 2019; 21:1-6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31339113>
6. Técnica ICSI para infertilidad masculina - IVI [Internet]. IVI. 2020. Available from: <https://ivi.es/tratamientos-reproduccion-asistida/icsi/>
7. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5th edn. Geneva: World Health Organization. 2010; 271.
8. Duttaa S, Majzoub A, Agarwal A. *Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management*. Arab Journal of Urology [Internet]. 2019;17(2):87-97. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31285919>
9. Sadler T. Langman. Embriología médica. 11th ed. Wolters Kluwer; 2020.
10. Martin-Hidalgo D, Bragado M, Batista A, Oliveira P, Alves M. *Antioxidants and Male Fertility: from Molecular Studies to Clinical Evidence*. Antioxidants [Internet]. 2019;2-15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30959797>
11. Blanes R. *Sperm DNA Fragmentation*. Assisted Reproductive Technology. 2020; 2-27.
12. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. *Oxidative stress and male infertility*. Nature reviews urology [Internet]. 2017 ;14:1-12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28508879>
13. Esteves S. Genetic Damage in Human Spermatozoa: *Interventions to prevent Sperm DNA Damage Effects on Reproduction* [Internet]. E. Baldi, M. Muratori; 2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31301050>

14. Redmon J, Drobnis E, Sparks A, et al. Semen and reproductive hormone parameters in fertile men with and without varicocele. *First International Journal of Andrology: Andrología*. 2019;1-6.
15. Pergialiotis V, Prodromidou A, Frountzas M, et al. *Diabetes mellitus and functional sperm characteristics: A meta-analysis of observational studies*. *Journal of Diabetes and its Complications* Pages [Internet]. 2016; 30(6):1167-1176. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27107613/?from_term=diabetes+and+sperm+function&from_filter=pubt.clinicaltrial&from_filter=pubt.meta
16. Wright C, Milne S, Leeson H. *Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility*. *Reproductive Biomedicine* [Internet]. 2014 ;28(6):685-695. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24745838>
17. Homa S, Vassiliou A, Stone J, et al. *A Comparison Between Two Assays for Measuring Seminal Oxidative Stress and their Relationship with Sperm DNA Fragmentation and Semen Parameters*. *Genes* [Internet]. 2019 ;10(3):2-13. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/3/236>
18. Cho C, Esteves S, Agarwal A. *Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation*. *Asian Journal of Andrology* [Internet]. 2016;18:188-191. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26732105>
19. Subramanian V, Ravichandran A, Thiagarajan N, et al. *Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility*. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* [Internet]. 2018;45(2):91-92. Available from: <https://ecerm.org/journal/view.php?doi=10.5653/cerm.2018.45.2.88>
20. Nowicka-Bauer K, Nixon B. *Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility*. *Antioxidants*. Newcastle, Australia: MDPI; 2020. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/2/134>
21. Kaur Bansal A, Bilaspuri G. *Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions*. [Internet]. 2010; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20871827/>
22. Ardoy Vilches M, Eibert Algam M, González Utor A, et al. *Cuadernos de Embriología Clínica: Indicadores de calidad del laboratorio de embriología: definición y especificaciones*. 1st ed. Madrid: Góballo, Agencia Creativa Digital; 2016.
23. Mateu L, Corral J, Melnick A, et al. *Tratamiento antioxidante en hombres con infertilidad idiopática*. *Revista Internacional de Andrología* [Internet]. 2017;15(2). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1698031X1630053X?via%3Dihub>