



Universidad de Granada

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ CLÍNICA DE SCSA Y
PGS-FISH EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO
DE LA PAREJA ESTÉRIL**

Sandra Zamora López

Granada, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sandra Zamora López
D.L.: Gr 221-2011
ISBN: 978-84-693-6701-8

D. FERNANDO RODRÍGUEZ SERRANO, PROFESOR AYUDANTE
DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA
HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. Sandra Zamora López ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: **“EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ CLÍNICA DE SCSA Y PGS-FISH EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA PAREJA ESTÉRIL”** que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 16 de julio de 2010

Fdo: Fernando Rodríguez Serrano

D. ANTONIO ROSALES MARTÍNEZ, DOCTOR EN QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACEÚTICA E INVESTIGADOR CONTRATADO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. Sandra Zamora López ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: **“EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ CLÍNICA DE SCSA Y PGS-FISH EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA PAREJA ESTÉRIL”** que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 16 de julio de 2010

Fdo: Antonio Rosales Martínez

D. JOSÉ ANTONIO CASTILLA ALCALÁ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “VIRGEN DE LAS NIEVES” DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Dña. Sandra Zamora López ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: “**EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ CLÍNICA DE SCSA Y PGS-FISH EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA PAREJA ESTÉRIL**” que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 16 de julio de 2010

Fdo: José Antonio Castilla Alcalá

Agradecimientos:

A D. José Antonio Castilla por la confianza depositada en mi y su docencia ejemplar. Gracias a su la infinita paciencia, comprensión y cariño. Ha sido un privilegio trabajar a su lado durante estos años.

A D. Fernando Rodríguez y D. Antonio Rosales por los conocimientos transmitidos y la colaboración en este proyecto. Gracias a su buen humor en mis momentos de desánimo.

A D. Luís Martínez por contribuir con su apoyo y enseñanzas a que este proyecto haya llegado a buen puerto. Gracias a su implicación en mi trayectoria.

A D. Juan de Dios Luna por su inestimable ayuda y sabios consejos para llevar a cabo esta tesis.

Gracias a Ana y a Mari Carmen por todo, porque me han enseñado con empeño. Por suerte, además de llevarme todo lo aprendido de esta experiencia, me queda su amistad.

A todo el personal de la Unidad de Reproducción del H. U. Virgen de las Nieves de Granada por el trato tan amistoso que me han dado. Trabajar a su lado ha sido muy agradable.

A todos mis compañeros del laboratorio: María, Belén, Jose Antonio, Irene y Noelia por haberme acompañado cada día y haber soportado con tan buen humor mis buenos y malos momentos. Ha sido un placer compartir también casa y vida con ellas: Ana, Rocío, Bea y Eva. A mis "responsables docentes", Mar y Marisa, porque gracias a las horas que pasamos juntas en los comienzos, con las tardes infinitas en el laboratorio, conocí a dos grandes embriólogas y amigas. Ha sido muy especial

coincidir con Rafa durante estos años; mi complemento en el quehacer diario del laboratorio y junto a Zule mi familia granadina. A todos, yo sigo apostando por el Kivi, algún día.

A Francis, porque sin ella ni el Máster ni los viajes a Jaen hubieran sido lo mismo.

A Mercedes, Yolanda y Patricia que han conseguido que mis dolores de espalda y mi estrés de estos meses desaparezcan como por arte de magia; gracias a su profesionalidad y cariño.

Gracias a mi familia, tios, primos y abuelas. Especialmente a mis dos abuelas, Marina y Francisca, por saber ser tan abuelas y mimarme desde siempre.

A Pablo Baruc, porque hemos aprendido a querer en la distancia, a superar sus dificultades y a ilusionarnos con el futuro. Futuro que se hace presente cada día gracias a su calma y serenidad en el transcurso de estos últimos años.

A mi hermana, Marta, que siempre ha estado ahí en los buenos y malos momentos. Y porque después de conversar con ella, los malos ya no lo son tanto, y los buenos son, por supuesto, mejores. Eres única.

Finalmente debo un especial agradecimiento a mis padres, Paco y Marina, que me han transmitido una maravillosa escala de valores en la vida, que me han apoyado incondicionalmente y han sabido siempre comprenderme y respetar mis decisiones. Son mi mejor ejemplo a seguir. Sin su cariño y apoyo esta tesis no hubiese podido llegar a término.

**A mis padres,
a mi hermana
y a Pablo Baruc.**

Así es mi vida,
piedra,
como tú. Como tú,
piedra pequeña;
como tú,
piedra ligera;
como tú,
canto que ruedas
por las calzadas
y por las veredas;
como tú,
guijarro humilde de las carreteras;
como tú,
que en días de tormenta
te hundes
en el cieno de la tierra
y luego
centelleas
bajo los cascotes
y bajo las ruedas;
como tú, que no has servido
para ser ni piedra
de una lonja,
ni piedra de una audiencia,
ni piedra de un palacio,
ni piedra de una iglesia;
como tú,
piedra aventurera;
como tú,
que tal vez estás hecha
sólo para una honda,
piedra pequeña
y
ligera...

León Felipe, *Versos y oraciones de caminante* (1920-1929).

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes **revistas** científicas:

- Castilla JA, Zamora S, Gonzalvo MC, Luna del Castillo JD, Roldán-Nofuentes JA, Clavero A, Björndahl L, Martínez L. Sperm chromatin structure assay and classical semen parameters: systematic review. *Reproductive Biomedicine Online* 2010; 1:114-124.
- Zamora S, Clavero A, Gonzalvo MC, Luna del Castillo JD, Roldán-Nofuentes JA, Álvarez C, Mozas J, Martínez L, Castilla JA. Why doesn't PGS-FISH work? What should we do to make it better? *Reproductive Biomedicine Online* (Sometido Abril 2010).
- Zamora S, Clavero A, Gonzalvo MC, Roldán MP, Peña R, Aguado JA, Rosales A, Molina I, Morales N, Castilla JA. Diagnóstico de esterilidad masculina no agresivo. Fernández-Parra J, Carrillo MP, Montoya Ventoso F, editores. *Actualización en Obstetricia y Ginecología 2010*. Albolote (Granada): Gráficas Fernando. ISBN: 978-84-693-1626-9.

y han sido presentados en las siguientes **reuniones** científicas nacionales:

- XXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) (Valencia, España). Mayo 2010.
- V Congreso Asociación Española para el estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR) (Valencia, España). Noviembre 2009.
- V Congreso Asociación Española para el estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR) (Valencia, España). Noviembre 2009.

e internacionales:

- 24th edition of the Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (Barcelona, España). Julio 2009.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. Diagnóstico y tratamiento de la pareja estéril	3
1.1 Estudio básico de esterilidad	4
1.1.1 Anamnesis de la mujer	4
1.1.2 Exploración ginecológica	7
1.1.3 Evaluación tubárica	7
1.2 Causas de esterilidad	9
1.3 Tratamiento de la esterilidad	11
2. Esterilidad por factor masculino	16
2.1 Diagnóstico andrológico mínimo	20
2.1.1 Anamnesis	20
2.1.2 Análisis de semen	21
2.2 Diagnóstico andrológico completo	26
2.2.1 Exploración física	26
2.2.2 Ecografía testicular	27
2.3 Diagnóstico andrológico complementario	27
2.3.1 Estudio endocrino	28
2.3.2 Estudio genético	29
2.3.2.1 Cariotipo	29

2.3.2.2 Microdeleciones del cromosoma Y	29
2.3.2.3 Mutaciones del gen de la fibrosis quística	29
2.3.3 Análisis de orina post-orgasmo	31
2.3.4 Estudio bacteriológico	31
2.3.5 Tests funcionales espermáticos	31
3. Evaluación del DNA espermático	32
3.2 Evaluación cuantitativa del DNA espermático	32
3.2.1 Hibridación in situ fluorescente del DNA espermático	32
3.2 Evaluación cualitativa del DNA espermático	33
3.2.1 Origen del daño en el DNA espermático	33
3.2.2 Condensación del DNA espermático	34
3.2.3 Fragmentación del DNA espermático	36
3.2.3.1 SCSA	37
3.2.3.2 SCD	38
3.2.3.3 Ensayo cometa	38
3.2.3.4 Túnel	39
3.2.3.5 Evaluación de la fragmentación del DNA	39
4. Selección embrionaria en fecundación in vitro	39
4.1 Selección embrionaria mediante morfología embrionaria	40
4.1.1 Evaluación ovocitaria	40

4.1.2 Evaluación del cigoto	42
4.1.3 Evaluación del embrión	45
4.1.4 Evaluación del blastocisto	54
4.2 Selección embrionaria mediante diagnóstico genético preimplantacional con screening de aneuploidías	56
4.2.1 Hibridación in situ fluorescente	57
4.2.2 Hibridación genómica comparada	58
5. Evaluación de tests diagnósticos	59
5.1 Validez diagnóstica	60
5.1.1 Tabla 2x2	60
5.1.2 Probabilidad pre-test	62
5.1.3 Sensibilidad y especificidad	62
5.1.4 Valores predictivos positivos y negativos	64
5.1.5 Exactitud diagnóstica	65
5.2 Validez clínica	66
5.2.1 Likelihood ratio positiva y negativa	66
5.2.2 Odds ratio diagnóstica	68
5.2.3 Odds pre-test, odds post-test y probabilidad post-tests	69
5.2.4 Nomograma de Fagan	70

6. Importancia de la probabilidad pre-test	
en la interpretación de un test	71
6.1 Escenarios clínicos en el diagnóstico y	
tratamiento de la esterilidad por factor masculino	72
6.1.1 Relaciones naturales	72
6.1.2 Fértiles vs estériles	73
6.1.3 Reproducción asistida	73
6.2 Escenarios clínicos en la selección embrionaria	73
6.2.1 Edad materna avanzada	74
6.2.2 Abortos de repetición	74
6.2.3 Fallo repetido de implantación	75
6.2.4 Factor masculino severo	75
OBJETIVOS	78
MATERIAL Y MÉTODOS	80
1. Escenarios clínicos analizados	80
1.1 Evaluación de la validez clínica del SCSA y los parámetros clásicos de	
semen en el diagnóstico del factor masculino	80
1.2 Evaluación de la validez clínica del PGS-FISH y la morfología	
embrionaria en la selección embrionaria	81
2. Búsqueda sistemática	82

2.1 Evaluación de la validez clínica del SCSA y los parámetros clásicos de semen en el diagnóstico del factor masculino	82
2.2 Evaluación de la validez clínica del PGS-FISH y la morfología embrionaria en la selección embrionaria	86
3. Análisis estadístico	90

RESULTADOS

1. Evaluación de la validez clínica del SCSA y los parámetros clásicos de semen en el diagnóstico del factor masculino	96
1.1 Resultado de la búsqueda sistemática de bibliografía	96
1.2 Análisis estadístico de las diferentes situaciones clínicas estudiadas	98
1.2.1 Relaciones naturales	98
1.2.2 Fértiles vs estériles	102
1.2.3 Reproducción asistida	106
2. Evaluación de la validez clínica del PGS-FISH y la morfología embrionaria en la selección embrionaria	110
2.1 Resultado de la búsqueda sistemática de bibliografía	110
2.2 Análisis estadístico	113
2.3 Validez clínica del modelo teórico de Los te al. (2004)	117

2.4 Influencia del método de selección embrionaria en la probabilidad de transferir al menos un embrión euploide	117
--	------------

DISCUSIÓN

1. Evaluación de la validez clínica del SCSA y los parámetros clásicos de semen en el diagnóstico del factor masculino	121
1.1 Relaciones naturales	123
1.2 Fértiles vs estériles	124
1.3 Reproducción asistida	127
2. Evaluación de la validez clínica del PGS-FISH y la morfología embrionaria en la selección embrionaria	130

CONCLUSIONES	141
---------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	144
---------------------	------------

Introducción

1. Diagnóstico y tratamiento de la pareja estéril

Las tasas de esterilidad según distintos estudios epidemiológicos se sitúan entre un 14-16% de las parejas en edad reproductiva. El 60% de las mismas en edad fértil consiguen quedar gestantes en 6 meses, el 85% en 12 meses y un 90% en 18 meses (Matorras and Hernández, 2007). La fecundidad mensual máxima de una pareja joven, con una mujer menor de 30 años, no es superior al 30% (Edwards, 1995; Ellis et al., 1996).

Se considera que una pareja padece esterilidad si tras 12 meses de relaciones sexuales sin métodos anticonceptivos no queda gestante. Sin embargo, distintos factores asociados podrían ser indicativos para iniciar el estudio básico de esterilidad a los 6 meses de relaciones sexuales sin métodos anticonceptivos y no obtención de embarazo (más de 35 años en la mujer, anormalidades menstruales, historia de enfermedad pélvica o testicular, endometriosis y cirugías a estos niveles) (WHO, 2010).

Existe controversia respecto a los términos que se emplean en la literatura para referirse a la esterilidad, infertilidad y subfertilidad. Según algunos autores, infertilidad debe reservarse para aquellas parejas que consiguen quedar embarazadas espontáneamente pero no consiguen un embarazo a término, ya que abortan. El término subfértil lo utilizan algunos autores para referirse a aquellas que no logran gestación tras 12 meses de relaciones, pero que con tratamientos específicos pueden conseguirlo. Por último, el término estéril se refiere a causas definitivas de esterilidad tales como ausencia de útero o de espermatozoides (Remohí et al., 2004). En la mayoría de la literatura en castellano se igualan los términos de subfertilidad y esterilidad.

1.1 Estudio básico de esterilidad

El principal objetivo del estudio básico de esterilidad es promover una actuación rápida y eficaz ante la pareja que inicia estudio por esterilidad. De esta manera, se pretenden evitar actuaciones innecesarias que no hayan demostrado un incremento de las tasas de embarazo y que, sin estar a veces exentas de riesgos, retrasan otras técnicas más convenientes.

La esterilidad es una enfermedad de la pareja y, como tal, hay que estudiar a ambos miembros en paralelo (Figura 1). Este estudio básico engloba:

- Anamnesis en ambos miembros de la pareja (para el varón ver sección 2.1.1).
- Exploración ginecológica a la mujer.
- Evaluación tubárica.
- Seminograma al varón (ver sección 2.1.2).

La evaluación inicial de la esterilidad masculina es simple, y por ello la realización de un seminograma debería preceder cualquier valoración invasiva en la mujer.

1.1.1 Anamnesis de la mujer

En la anamnesis de la mujer deberían cuestionarse y determinarse los aspectos y parámetros que se citan a seguidamente.

- Historia médica
 - Identificar otras patologías no ginecológicas pero con repercusión reproductiva.
 - Identificar el consumo de medicamentos, así como de tabaco, alcohol y otras drogas.
 - Determinar el índice de masa corporal y posible sobrepeso para aconsejar programas de adelgazamiento, incluso en pacientes normoovuladoras.
 - Medir la presión arterial y realizar analítica general con serologías para investigar inmunización frente a rubeola, aconsejando vacunación en caso de ser negativa. En la actualidad se debate sobre la conveniencia de investigar la inmunidad frente a toxoplasma durante el embarazo, pero una determinación pregestacional positiva nos permitirá considerar inmunizada a la futura gestante (González, 2001). También debe investigarse el estado serológico frente a Lues, VHB, VHC y VIH.

- Historia familiar

Ha de incluir el número de hermanos, los antecedentes de enfermedades de padres y hermanos, especialmente esterilidad y anomalías hereditarias, y la consanguinidad de los padres.

- Historia reproductiva
 - Duración de la esterilidad con la pareja actual y fertilidad previa.

- Enfermedades de la infancia e historia del desarrollo somático y puberal.
- Antecedentes quirúrgicos, historia sexual y genitourinaria, incluyendo enfermedades de transmisión sexual y exposición a gonadotoxinas.
- Antecedentes de patología ovárica.
- Frecuencia coital y posibles disfunciones sexuales.

La ovulación es un requisito imprescindible para la concepción, y por ello debe investigarse siempre. Los desórdenes ovulatorios suponen, aproximadamente, hasta un 15-25% de las causas de esterilidad (Mosher and Pratt, 1991). Una historia de ciclos menstruales regulares (24-35 días) se correspondería con una correcta ovulación en un 97% de los casos (Magyar et al., 1979).

Las determinaciones rutinarias de FSH, LH, TSH, prolactina y andrógenos tienen interés en mujeres con desórdenes ovulatorios con objeto de orientar la localización de la patología (prolactina y TSH en patología hipofisaria; FSH y LH para identificar hipogonadismos hipo o hipergonadotropos así como criterios diagnósticos de SOP, 17-OH progesterona en hiperplasia suprarrenal; SDHEA y testosterona en hirsutismo) (González et al., 2007).

En mujeres de más de 35 años deberá investigarse el concepto de reserva ovárica y realizar un asesoramiento al respecto (Bukulmez and Arici, 2004). Para estudiar la reserva ovárica se pueden utilizar determinaciones ecográficas (recuentos foliculares antrales,...), determinaciones hormonales basales (FSH en día 3) o tests dinámicos como el de clomifeno o el de EFFORT.

En caso de esterilidad secundaria ha de registrarse el tiempo requerido para lograr cada una de las gestaciones previas. Si hay abortos previos ha de evaluarse la semana gestacional en la que ocurrieron y el diagnóstico etiológico si lo hubiere.

1.1.2 Exploración ginecológica

Se realizará exploración ginecológica completa con citología cérvico-vaginal. En caso de sospecha clínica de enfermedades de transmisión sexual deberán realizarse cultivos y pruebas pertinentes para su confirmación. Se debe investigar la presencia de Chlamydia en el tracto genital femenino, especialmente si se van a plantear posteriormente pruebas invasivas como la histerosalpingografía (HSG).

1.1.3 Evaluación tubárica

Si los resultados de la exploración ginecológica y la ecografía vaginal son normales, y el resultado del seminograma también es normal (en mujeres estériles sin antecedentes de interés: enfermedad inflamatoria pélvica, ectópico previo o endometriosis) se debe realizar una HSG para evaluar útero y trompas.

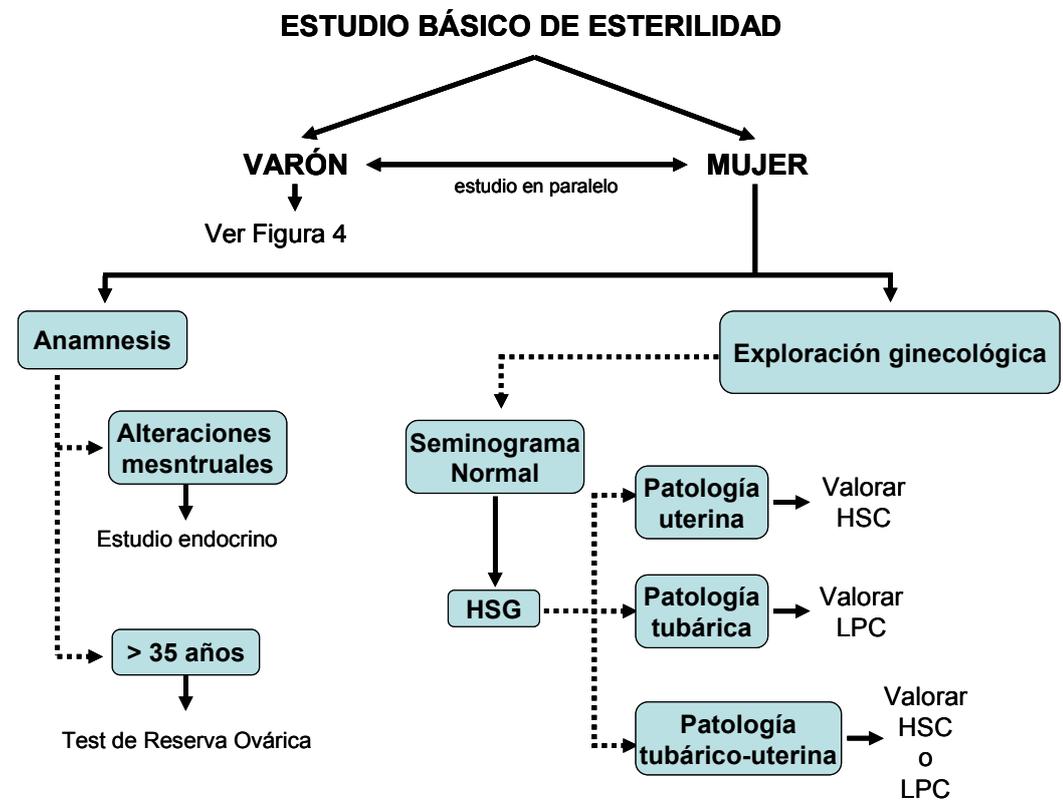
El estudio de las obstrucciones parciales o totales de las trompas de Falopio y las adherencias periováricas se realiza tradicionalmente mediante HSG, y más recientemente con (HsonoSG).

Tras la HSG o Histerosonosalpingografía (HsonoSG) se podrán descartar anomalías congénitas o estructurales ante la sospecha de patología uterina.

Si el resultado de la HSG muestra anomalías uterinas se debe recomendar la histeroscopia. Esta técnica permite visualizar la cavidad uterina de forma precisa tras ser distendida con un medio salino. No obstante, se trata de un método invasivo y costoso, por lo que se reservará para ser realizada con fines terapéuticos (resección de tabique uterino, de pólipo o mioma submucoso). Sólo se realizará con fines diagnósticos cuando la HSG de resultados dudosos

Si la HSG muestra anomalías tanto en las trompas como en el útero se puede valorar realizar una laparoscopia. Esta técnica deberá realizarse tan solo bajo fuerte sospecha de patología, con objeto de confirmarla e intentar tratarla en el mismo acto quirúrgico (adheriolisis, quistectomía de endometriomas, fimosis de fimbrias tubáricas) (Jacobson et al., 2002; Opsahl et al., 1993).

Figura 1. Estudio básico de la pareja estéril.



HSG, histerosalpingografía; HSC, histerocopia; LPC, laparoscopia.

Algunos hallazgos del estudio básico de esterilidad llevarán a realizar otras pruebas diagnósticas (carotipo, estudio de fibrosis quística, etc).

1.2 Causas de esterilidad

Si tras la realización de un correcto estudio de esterilidad encontramos alteraciones en la historia clínica, exploración física del varón o análisis de semen hablaremos de esterilidad por factor masculino.

Ante alteraciones endocrinas femeninas hablaremos de esterilidad por factor endocrino. La HSG y/o ecografía vaginal detectará alteraciones tubáricas o uterinas, hablando entonces de esterilidad por factor tubárico (tuboperitoneal) o factor uterino respectivamente. Los factores cervicales son una causa inusual de esterilidad, aunque vaginitis, cervicitis, traumatismos cervicales o cualquier situación que modifique el cérvix pueden tener un impacto negativo en el volumen o calidad del moco cervical y con ello imposibilitar la concepción (Matorras and Hernández, 2007).

No siempre hay una única causa de esterilidad, encontrándose dos o más causas en casi un 30% de los casos (Rantala, 1988).

No obstante, incluso tras la realización de las más sofisticadas pruebas diagnósticas, la etiología de la esterilidad se desconoce en el 15-30% de las parejas estériles (esterilidad sin causa aparente -ESCA-) (Vanrell et al., 1993). En ESCA de menos de 3 años de evolución y mujer menor de 35 años el pronóstico es bueno, incluso sin tratamiento (ESHRE Capri Workshop Group, 2009).

De manera global, el 35% de las parejas presentan esterilidad de causa femenina (tubárica, uterina, endocrina o cervical) y otro 35% presentan esterilidad de causa masculina. El 15% presentan alteraciones en ambos miembros de la pareja (esterilidad de causa mixta). Y por último, otro 15% no presentan alteraciones tras el estudio básico de esterilidad (ESCA) (Nicolás et al., 2004).

1.3 Tratamiento de la esterilidad

El 50% de las parejas estériles resolverán su enfermedad mediante tratamientos médicos adecuados (antibioterapia en caso de infecciones, tratamientos farmacológicos en caso de alteraciones endocrinas leves, cirugía, etc.) o medidas sexuales apropiadas (coito programado, apoyo psicológico, educación sexual, etc.) (González et al., 2007).

Aproximadamente el 50% restante de las parejas estériles necesitará de técnicas de reproducción asistida para obtener una gestación.

La reproducción asistida engloba un conjunto de técnicas encaminadas a facilitar la fecundación del ovocito. Dentro de estas técnicas de reproducción asistida (TRA) se encuentran la inseminación artificial (IA), la fecundación in vitro (FIV) y la microinyección espermática intracitoplasmática (ICSI). En la mayoría de las técnicas de reproducción asistida es necesario realizar previamente tratamientos para la estimulación de la ovulación en la mujer, pues esto va a permitir aumentar considerablemente la tasa de éxito (ya que en vez de madurar un solo ovocito por ciclo se consigue que maduren varios). El seguimiento de la estimulación ovárica se realiza mediante ecografía ovárica vía vaginal únicamente (inseminación artificial) o acompañado de determinación de niveles séricos de estradiol (FIV/ICSI) (Matorras and Hernández, 2007).

La IA consiste en depositar espermatozoides en el tracto genital femenino. Según el tipo de semen utilizado la inseminación artificial se denomina de diferente forma.

- Inseminación artificial conyugal (IAC): inseminación artificial con semen de la pareja.
- Inseminación artificial de donante (IAD): inseminación artificial con semen de donante.

La inseminación puede ser intracervical o intrauterina según el lugar donde se deposite el semen. La tasa de embarazo es significativamente mayor con la inseminación intrauterina que con la inseminación intracervical, por lo que la primera es la más habitual (ESHRE Capri Workshop Group, 2009).

En la IAC la muestra de semen se obtiene por masturbación en el mismo día en que se va a realizar la inseminación. Se recomienda al varón una abstinencia sexual previa con el objetivo de maximizar la calidad de la muestra seminal en número y calidad de los espermatozoides. En la IAD el semen se descongela el mismo día de la inseminación, previa asignación del donante según las características fenotípicas de la pareja (Clavero et al., 2007).

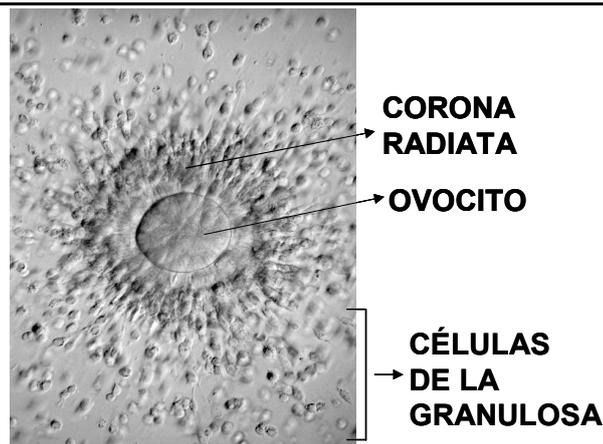
La muestra de semen se debe manipular en el laboratorio antes de la inseminación con dos objetivos. Primero, aislar un alto porcentaje de espermatozoides funcionales con una alta movilidad y sin anomalías morfológicas de otros espermatozoides no viables, células y restos celulares presentes en el semen. Segundo, eliminar el plasma seminal (así como prostaglandinas, agentes infecciosos y otras sustancias presentes en él) que impediría la capacitación espermática (Sellés et al., 2004).

La FIV hace referencia al desarrollo del embrión en el laboratorio desde de los primeros estadios hasta el día quinto o sexto tras la

fecundación. Una definición adecuada del procedimiento conocido como FIV sería: fecundación y progreso de los primeros estadios embrionarios fuera del organismo. Según el método de fecundación podemos hablar de FIV convencional o de microinyección espermática intracitoplasmática (ICSI) (Galán et al., 2004).

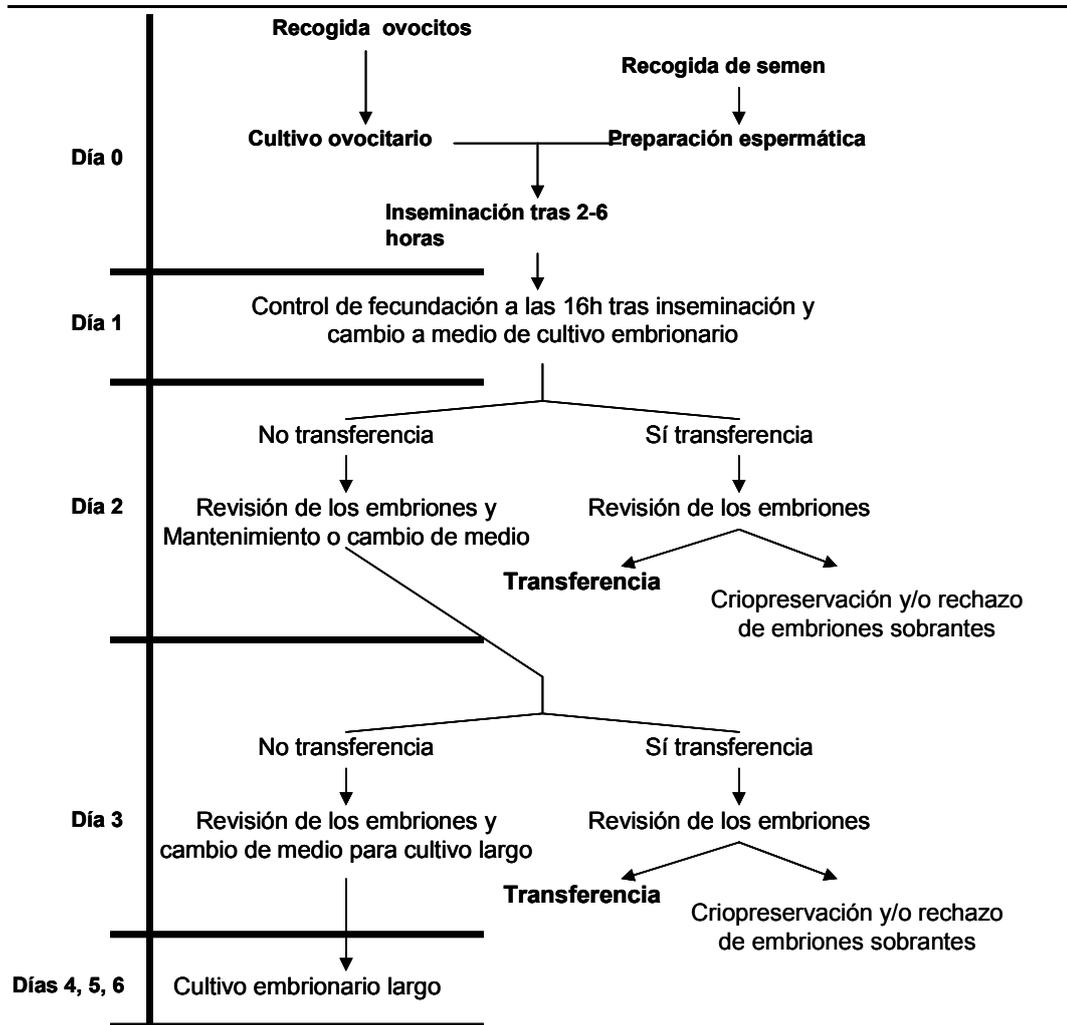
Como se ha comentado anteriormente, para llevar a cabo estas TRA es necesario realizar una estimulación de la ovulación en la mujer. Cuando, tras estimulación, el tamaño de los folículos ováricos ha alcanzado entre 17 y 21 mm se procede a desencadenar la ovulación mediante hormona gonadotropina coriónica (hCG), hormona gonadotropina luteinizante recombinante (LHr) o agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). A las 36 horas de esta inyección, mediante punción folicular ecoguiada, se procede a la aspiración de los folículos ováricos. El líquido folicular es trasladado al laboratorio de reproducción asistida donde se realiza la identificación de los complejos cúmulo-corona-ovocito (Figura 2).

Figura 2. Complejo cúmulo-corona-ovocito



En función de la técnica que se vaya a emplear, FIV o ICSI, el tratamiento del complejo cúmulo-corona-ovocito será diferente. En la FIV convencional se cultiva cada complejo con los espermatozoides a una concentración determinada, mientras que en ICSI se decumulan los complejos y cada ovocito será micronyectado con un espermatozoide. Al día siguiente se comprueba la fecundación, realizándose la transferencia de embriones al útero dos o tres días después de la punción folicular. Los embriones sobrantes se crioconservan en nitrógeno líquido. En el diagrama siguiente se esquematizan las diferentes etapas de laboratorio en FIV/ICSI (Figura 3).

Figura 3. Etapas de laboratorio en FIV/ICSI



En pacientes con fallos repetidos de implantación (RIF) tras transferencias de embriones de buena calidad se ha sugerido la realización de transferencia de blastocistos, eclosión asistida o diagnóstico genético preimplantacional con screening de aneuploidías (PGD-AS). Actualmente la indicación de estas técnicas está en revisión, pues no existe evidencia suficiente para recomendarlas (Vidal et al., 2007). La primera consiste en prolongar el cultivo de los embriones hasta el día+5 de su desarrollo mediante técnicas de cocultivo con diferentes

líneas celulares (células VERO, endometriales,...) o utilizando medios de cultivo secuencial. La eclosión asistida consiste en realizar una apertura en la zona pelúcida del embrión que le facilite su abandono en el proceso de eclosión. Dicha apertura puede realizarse mecánica, químicamente (ácido tyrode) o mediante láser (Calderón et al., 2004).

El PGD-AS consiste en biopsiar una o dos blastómeras de un embrión conseguido por ICSI para determinar su contenido cromosómico mediante técnicas de hibridación in situ, o analizar su contenido génico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para realizar la biopsia se realiza una apertura en la zona pelúcida del embrión de igual modo que se indicó anteriormente para la eclosión asistida. También se puede biopsiar el primer o segundo corpúsculo polar con el objeto de analizar su información genética (Aragonés et al., 2004).

Otra indicación de las técnicas de reproducción asistida es satisfacer los deseos reproductivos de parejas con enfermedades infecciosas transmisibles (HIV, hepatitis C,...) para reducir al mínimo el riesgo de contagio del otro miembro de la pareja o de la descendencia. En caso del varón seropositivo es necesario realizar una doble preparación del semen en el laboratorio (gradientes de densidad y después swim-up) y analizar la carga viral en esta muestra preparada. El manejo de los gametos y embriones de estas parejas debe realizarse bajo normas de seguridad biológicas adecuadas (Castilla and Magán, 2003).

2. Esterilidad por factor masculino

Como ya se ha comentado, el factor masculino está presente, ya sea como factor único o de manera combinada con otro factor, en aproximadamente el 45% de las parejas estériles. La esterilidad

masculina puede tener su origen en diversas causas o factores de riesgo que a menudo actúan conjuntamente. Algunas de ellas son identificables y reversibles (obstrucción de los conductos eyaculadores o hipogonadismo hipogonadotrófico) y otras identificables pero no reversibles (atrofia testicular bilateral secundaria a orquitis urliana). Cuando no resulta posible esclarecer la etiología de la alteración se califica de esterilidad idiopática.

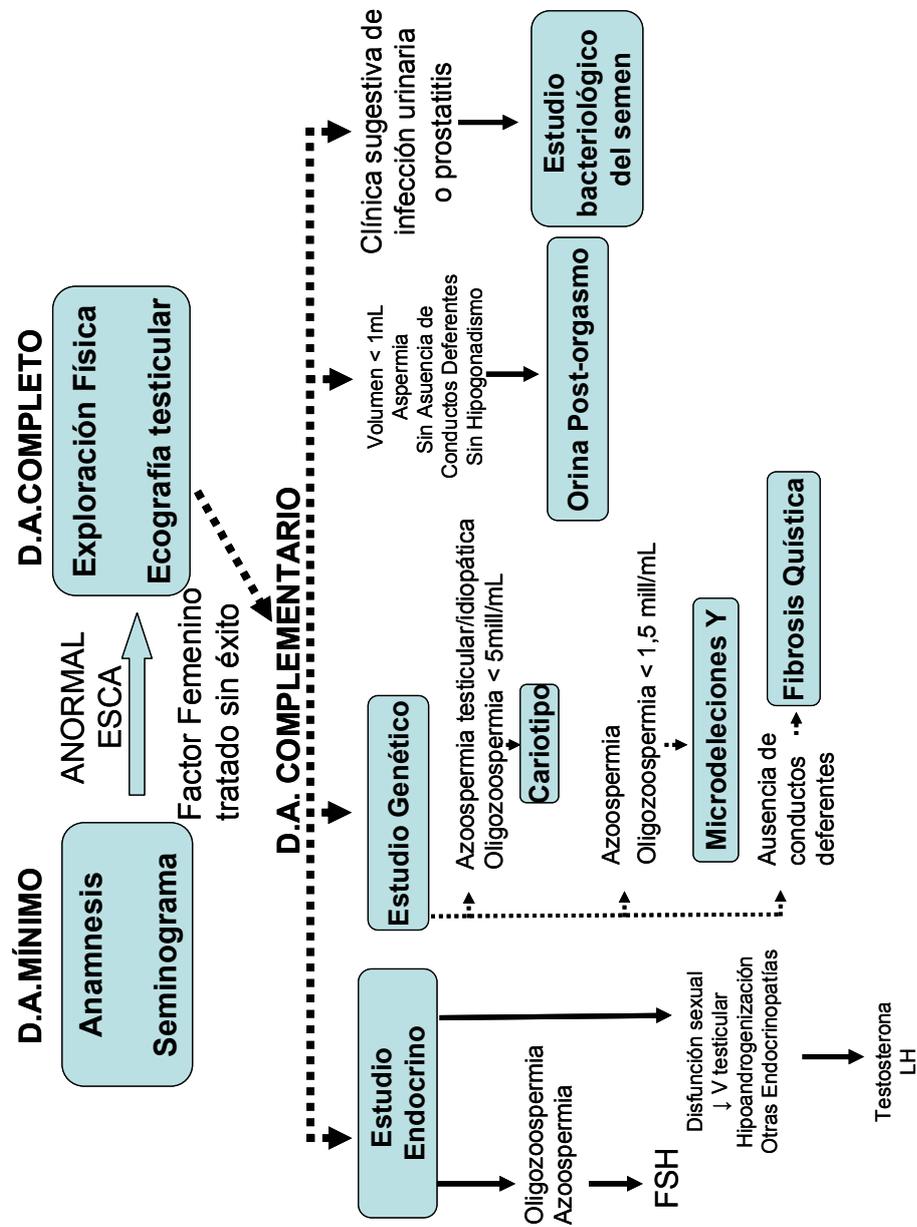
El propósito de la evaluación del varón es la identificación de alteraciones causantes de esterilidad. El tratamiento de las alteraciones reversibles puede incrementar la posibilidad de concepción mediante relaciones naturales o reproducción asistida. Por el contrario, la identificación de causas irreversibles y sin posibilidad de tratamiento evita a la pareja la incomodidad de realizar tests diagnósticos inadecuados o intentar terapias ineficaces (Jarrow and Sigman, 1999).

Por tanto, para el estudio de la esterilidad masculina se deben cumplir los objetivos que se describen a continuación.

- Identificar patologías y factores de riesgo que causan esterilidad masculina o que contribuyen a ella (Nieschlag and Behre, 1997).
- Orientar la estrategia terapéutica, tratando o corrigiendo las causas cuando sea posible, o bien proponiendo las mejores alternativas en reproducción asistida (Weidner et al., 2002).
- Identificar anomalías genéticas transmisibles a la descendencia (Shah et al., 2003).
- Identificar patologías relevantes para la salud del varón (Honig et al., 1994).

La evaluación del varón programada y basada en criterios de medicina basada en la evidencia debe ser escalonada, iniciándose con el diagnóstico andrológico mínimo, continuándose con el diagnóstico andrológico completo, y complementándose con aquellos tests o estudios que el clínico recomiende en base a los resultados de la evaluación completa (Figura 4).

Figura 4. Diagnóstico andrológico en el estudio de la pareja estéril



2.1 Diagnóstico andrológico mínimo

La evaluación inicial del varón debe incluir la anamnesis y un seminograma (si el resultado del mismo está por debajo de los valores de referencia deberá repetirse transcurridas 1-3 semanas) (WHO, 2010).

2.1.1 Anamnesis

- Historia médica

Se realiza para identificar factores de riesgo y patrones de comportamiento que pueden tener impacto significativo en la esterilidad masculina (gestación y parto propio, desarrollo y pubertad, historia genitourinaria, patologías de riesgo).

- Historia reproductiva
 - Duración de la esterilidad con la pareja actual y fertilidad previa.
 - Enfermedades de la infancia e historia de desarrollo somático y puberal.
 - Antecedentes quirúrgicos historia sexual y genitourinaria, incluyendo enfermedades de transmisión sexual exposición a gonadotoxinas (incluyendo altas temperaturas).
 - Antecedentes de patología testicular (mal descenso, inflamación, traumatismos).
 - Frecuencia coital y posibles disfunciones sexuales.

- Historia familiar

Ha de incluir el número de hermanos, los antecedentes de enfermedades de padres y hermanos, especialmente esterilidad y anomalías hereditarias, y la consanguinidad de los padres.

En caso de esterilidad secundaria ha de registrarse el tiempo requerido para lograr cada una de las gestaciones previas. Si hay abortos previos ha de evaluarse la semana gestacional en la que ocurrieron y el diagnóstico etiológico si lo hubiere.

Ha de registrarse el consumo previo y actual de medicamentos y sustancias tóxicas.

2.1.2 Análisis de semen

Para una correcta realización e interpretación de un análisis de semen deben tenerse presentes diferentes aspectos previos y posteriores al análisis, así como la utilización de técnicas y criterios reconocidos internacionalmente como los editados por la OMS o la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (Kvist and Björndhal, 2002), y aplicar procedimientos de control de calidad interno y externo.

Es importante tener en cuenta que los parámetros clásicos de semen (CSP) reflejan el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y nos orientan sobre patologías del sistema genital. Sólo excepcionalmente, como en casos de ausencia total de espermatozoides (azoospermia) o movilidad (astenozoospermia total), predicen la fertilidad de un varón, ya que dichos estados pueden ser transitorios y la esterilidad es un concepto que hace referencia a la pareja.

Los espermatozoides se acumulan en el epidídimo una vez que han sido liberados a la luz de los túbulos seminíferos. Cuando el contenido del epidídimo supera la capacidad del mismo, los espermatozoides rebosan y pasan a la uretra para ser eliminados con la orina (Cooper et al., 1993; De Jonge et al., 2004). La viabilidad del espermatozoide y de su cromatina se pueden ver afectadas por mayores tiempos de abstinencia sexual si existe algún trastorno funcional en el epidídimo (Correa-Perez et al., 2004). Por ello es importante conocer el tiempo transcurrido desde la última actividad sexual, recomendándose el análisis de semen tras un período de abstinencia sexual de 2 a 7 días (WHO, 2010).

Sin embargo, también es importante reportar el período de abstinencia sexual desde la penúltima eyaculación debido a que el contenido del epidídimo no se vacía por completo tras una eyaculación (Cooper et al., 1993).

La OMS (WHO, 2010), en sus recomendaciones para el análisis de semen, divide las magnitudes biológicas a estudiar en básicas, opcionales y avanzadas, en base a la información e importancia que tienen en el análisis de semen (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de parámetros a incluir en un análisis de semen según OMS-10 en base a la importancia de la información que suministran

Básicos	Examen macroscópico: licuefacción, aspecto, volumen, viscosidad, pH Concentración de espermatozoides y otras células Movilidad Vitalidad Morfología espermática Presencia de aglutinaciones Detección de anticuerpos antiespermatozoide unidos a la superficie espermática
Opcionales	Índice de teratozoospermia Test hipoosmótico Cultivos seminales Análisis bioquímicos del líquido seminal Análisis automático de la movilidad espermática Test del ovocito de hámster
Avanzados	Test de funcionalidad espermática Especies reactivas de oxígeno Test de unión a zona pelúcida Evaluación de la reacción acrosómica Análisis automático de morfología espermática Técnicas de recuperación de espermatozoides móviles Swim-up Gradientes de densidad

Un seminograma debe, como mínimo, incluir los parámetros básicos obligatorios: valoración macroscópica (licuefacción, aspecto, volumen, viscosidad y pH), concentración de espermatozoides y otras células, movilidad, vitalidad y morfología espermática, presencia de aglutinaciones y detección de anticuerpos antiespermatozoide unidos a la superficie espermática, cuyos límites inferiores de referencia se muestran en la Tabla 2 (WHO, 2010).

 Tabla 2. Límites inferiores de referencia en los parámetros de semen según manual de la OMS-10 de análisis de semen

Propiedades	Límite inferior de referencia (Intervalo de confianza)
Volumen (ml)	1.5 (1.4 – 1.7)
Movilidad total (progresivos + no progresivos, %)	40 (38 – 42)
Movilidad progresiva	32 (31 – 34)
Vitalidad (vivos, %)	58 (55 - 63)
Nº total de espermatozoides (10^6 /eyaculado)	39 (33 - 46)
Concentración de espermatozoides (10^6 /mL)	15 (12 - 16)
Morfología espermática (normal, %)	3 (2 - 4)
Viscosidad (cm)	2
Licuefacción	Completa
Color	Nacarado
pH	7.2

Los valores de referencia del semen presentan una limitación respecto a la superposición que existe en la distribución de los parámetros seminales entre varones de parejas fértiles y varones de parejas estériles, debido a la interrelación entre capacidad reproductiva masculina y femenina. De esta forma, dos varones con la misma calidad seminal (ej. 20 mill/mL) pueden ser considerados de pareja fértil (por tener su pareja un alto potencial reproductivo y conseguir gestación) o de pareja estéril (por tener su pareja reducida su capacidad reproductiva no conseguir gestación).

En función del resultado obtenido en el seminograma se distinguen las patologías que se describen a continuación.

- **Aspermia:** ausencia de semen tras sensación de orgasmo.
- **Astenozoospermia:** porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite inferior de referencia.
- **Astenoteratozoospermia:** porcentaje de espermatozoide móviles progresivos y espermatozoides morfológicamente normales por debajo del límite inferior de referencia.
- **Azoospermia:** ausencia de espermatozoides en el eyaculado, definido como el límite inferior de cuantificación por el método de conteo utilizado.
- **Criptozoospermia:** ausencia de espermatozoides en la muestra en fresco y presencia en el pellet tras centrifugado de la muestra.
- **Hemospermia:** presencia de eritrocitos en el eyaculado (Hematospermia).
- **Leucospermia:** presencia de leucocitos en el eyaculado (Leucocitospermia, piospermia).
- **Necrozoospermia:** bajo porcentaje espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado.
- **Normozoospermia:** número total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y espermatozoides con morfología normal por encima del límite inferior de referencia.
- **Oligoastenozoospermia:** número total de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite inferior de referencia.
- **Oligoastenoteratozoospermia:** número total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y

espermatozoides con morfología normal por debajo del límite inferior de referencia.

- **Oligoteratozoospermia:** número total de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides con morfología normal por debajo del límite inferior de referencia.
- **Oligozoospermia:** número total de espermatozoides por debajo del límite inferior de referencia.
- **Teratozoospermia:** porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite inferior de referencia.

2.2 Diagnóstico andrológico completo

Este estudio comienza tras haber realizado el diagnóstico andrológico mínimo en las situaciones que se describen seguidamente.

- La anamnesis pone en evidencia factores asociados a esterilidad.
- El seminograma está por debajo de los valores de referencia.
- Existe ESCA.
- El factor femenino ha sido tratado y la esterilidad persiste.

2.2.1 Exploración física

La exploración física del varón estéril se debe centrar en los aspectos que se describen posteriormente.

- Examen del pene identificando la ubicación adecuada del meato uretral.
- Palpación del contenido escrotal evaluando el volumen y consistencia de los testículos.

- Presencia, consistencia y características de los epidídimos y de los conductos deferentes.
- Identificación de dilatación de las venas del plexo pampiniforme en bipedestación y mediante la maniobra de Valsalva.
- Caracteres sexuales secundarios, distribución de la grasa corporal, vello facial y corporal, y datos antropométricos (peso, talla, braza).
- Presencia de ginecomastia.
- Tacto rectal, describiendo las características de la próstata y la presencia de vesículas seminales palpables.

2.2.2 Ecografía testicular

Esta técnica está indicada para confirmar la sospecha de varicocele y examinar el parénquima testicular y los epidídimos en casos de maldescenso testicular u otros hallazgos anormales. Las técnicas de imagen pueden aportar información útil cuando la exploración física del escroto es anormal o difícil. A nivel escrotal puede orientar los posibles signos de obstrucción (rete testis, epidídimos) y evidenciar signos de disgenesia testicular (alteraciones parenquimatosas o microcalcificaciones).

2.3 Diagnóstico andrológico complementario

En base a los resultados de la evaluación completa, el clínico recomendará otros estudios complementarios para aclarar la etiología de la esterilidad (ASRM, 2006).

2.3.1 Estudio Endocrino

Los niveles de FSH se deben analizar si existe oligozoospermia (<10 millones/mL) o azoospermia. Además, se evaluará la LH y la testosterona si hay disfunción sexual asociada, volumen testicular bajo, signos de hipoandrogenización u otras endocrinopatías (Tabla 3) (ASRM, 2006). El hipogonadismo secundario es una condición infrecuente, pero su identificación es importante porque puede ser tratado médicamente (Funació Puigvert, 2009).

Tabla 3. Niveles hormonales basales en diferentes estados clínicos

Condición clínica	FSH	LH	Testosterona	Prolactina
Espermatogénesis Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Hipogonadismo Hipogonadotrópico	↓	↓	↓	Normal
Espermatogénesis Anormal	↑/Normal	Normal	Normal	Normal
Hipogonadismo Hipergonadotrópico	↑	↑	Normal /↓	Normal
Hiperprolactinemia	Normal/↓	Normal/↓	↓	↑

FSH, hormona folículo estimulante; LH, hormona gonadotrópica luteinizante.

Se ha propuesto que la inhibina B puede complementar la información proporcionada por la FSH para determinar la reserva espermática en azoospermia no obstructiva (Ballescá et al., 2000; Bassas, 2009), aunque su determinación no es sistemática en la actualidad (De Braekeleer and Dao, 1991).

2.3.2 Estudio Genético

2.3.2.1 Cariotipo

La incidencia de anomalías cromosómicas en varones de parejas estériles oscila entre el 5 y el 15%, según la gravedad de las alteraciones espermáticas observadas. La mayor parte de estas anomalías afectan a los cromosomas sexuales (Funació Puigvert, 2009).

El análisis del cariotipo debe considerarse obligatorio en todos los casos de azoospermia de origen testicular o idiopático, y es recomendable en oligozoospermias con <5 millones/mL, especialmente si van a ser tratados mediante FIV/ICSI (De Braekeleer and Dao, 1991).

2.3.2.2 Microdeleciones del cromosoma Y

Las microdeleciones del cromosoma Y son más frecuentes en la población estéril. Las microdeleciones se han encontrado en tres regiones del brazo largo del cromosoma Y (AZFa, b, c). Es deseable la búsqueda de microdeleciones en pacientes con espermatogénesis gravemente alterada (azoospermia y oligozoospermia < 2 millones/mL), estimándose su prevalencia alrededor del 6% en varones oligozoospermicos con menos de 2 millones/mL (Ferlin et al., 2007).

2.3.2.3 Mutaciones del gen de la Fibrosis Quística (CFTR)

Se debe realizar estudio del gen de la fibrosis quística si existe ausencia congénita de uno o ambos conductos deferentes en la exploración física, denominada agenesia de conductos deferentes (ACD). La ACD puede estar acompañada de alteraciones variables en el

desarrollo de órganos procedentes de los conductos de Wolf, tales como epidídimo, vesícula seminal o ampolla deferencial y puede ser bilateral o unilateral. Cuando es bilateral (ABCD) suele detectarse durante el estudio de la esterilidad masculina. La agenesia unilateral (AUCD) puede presentarse con azoospermia u oligozoospermia, pero también con fertilidad conservada, y constituye un hallazgo durante las intervenciones de vasectomía, o al explorar a pacientes con agenesia renal.

Cuando el estudio mutacional de la fibrosis quística en el varón es positivo, se tiene que realizar este estudio mutacional a la mujer. En la población general el riesgo de ser portador se estima en 1/25. El estudio genético incluye el análisis de las 33 mutaciones más frecuentes en fibrosis quística. Si el resultado del estudio mutacional en la mujer es negativo y no existe clínica sugestiva, el riesgo final de ser portadora se estima en 1/240. Por tanto, un varón portador y su pareja con resultado negativo para la fibrosis quística tienen una probabilidad 1/960 de tener un hijo afecto. Si la probabilidad de tener descendencia afectada se considera suficientemente baja se plantearán técnicas de reproducción asistida.

De cualquier manera, el consejo genético se ofrecerá a todas las parejas según los resultados obtenidos en cada caso. El riesgo no debe evaluarse sólo cuantitativamente, puesto que la combinación de mutaciones más o menos graves de los progenitores determina distintas posibilidades fenotípicas en los hijos. Por tanto, el estudio mutacional del gen CFTR es necesario para realizar un consejo genético personalizado y decidir la opción más apropiada conjuntamente con la pareja.

2.3.3 Análisis de orina post-orgasmo

La hipospermia o aspermia (si se ha descartado agenesia de conductos deferentes e hipogonadismo) pueden deberse a eyaculación retrógrada, especialmente en pacientes con riesgo de presentar neuropatía vegetativa (diabetes, traumatizados,...). Esta alteración se confirma mediante un análisis de la orina postorgasmo.

2.3.4 Estudio bacteriológico del semen

Este estudio se realiza para confirmar la existencia de infección en pacientes con clínica sugestiva de infección urinaria o prostatitis. Algunos autores sugieren que la prueba de Stamey (sedimento y cultivo pre y post masaje prostático) es más sensible desde el punto de vista diagnóstico (Funació Puigvert, 2009).

2.3.5 Test funcionales espermáticos

El valor clínico de los parámetros clásicos de semen ha sido cuestionado por diferentes autores, tales como Glazener et al., (1987), Polansky and Lamb (1988), Bonde et al., (1998), Chia et al., (1998), Zinaman et al., (2000), y Álvarez et al., (2003), y más recientemente Haugen et al., (2006), Iwamoto et al., (2006), Nallella et al., (2006), Swan (2006) y Lewis (2007). En consecuencia otros tests funcionales espermáticos han sido propuestos para evaluar el DNA espermático (ver sección 3. Evaluación del DNA espermático).

3. Evaluación del DNA espermático

La evaluación del DNA espermático puede realizarse a dos niveles: cualitativo y cuantitativo. El primero hace referencia al número de cromosomas y el segundo a la condensación e integridad del DNA espermático.

3.1 Evaluación cuantitativa del DNA espermático

3.1.1 Hibridación in situ fluorescente del DNA espermático

Las aneuploidías son las anomalías cromosómicas más frecuentes en los espermatozoides humanos. La mayor parte de estas anomalías resultan de errores de meiosis durante el proceso de gametogénesis en los padres. En varones estos errores pueden llevar a la producción de espermatozoides con anomalías numéricas de los cromosomas, y por esta razón existen autores que recomiendan la hibridación in situ fluorescente (FISH) en el contexto de diagnóstico clínico (Sarrete and Anton, 2009).

No obstante, esta técnica presenta varias limitaciones, ya es un procedimiento costoso, con un limitado número de sondas disponibles en la actualidad y con una gran variabilidad intraindividual en la frecuencia de aneuploidías espermáticas (Tempest et al., 2009). Además su realización e interpretación no está exenta de determinada variabilidad intra observador y entre laboratorios. Por ello, la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) recomienda participar en programas de control de calidad externo para FISH al menos anualmente (Thornhill et al., 2005).

3.2 Evaluación cualitativa del DNA espermático

3.2.1 Origen del daño en el DNA espermático

En su estado normal, el DNA en el espermatozoide maduro es una estructura condensada, compacta e insoluble altamente dependiente de la presencia de zinc estabilizante en la cromatina (Björndahl, 1986). Con esta estructura el DNA del espermatozoide se encuentra protegido del daño que puede sufrir durante el transporte a través de los tractos reproductivos masculinos y femeninos. Es durante la espermatogénesis cuando puede originarse daño en el DNA.

La espermatogénesis es el proceso de proliferación y maduración de las células germinales masculinas que comienza a partir de espermatogonias diploides y conduce a la formación de espermatozoides maduros haploides (De Krester et al. 1998). En cualquier etapa de este proceso se puede producir daño en el DNA espermático (Erenpreiss et al. 2006). Sobre la naturaleza de este daño se sabe que es un fenómeno multifactorial y no del todo delimitado, aunque se conocen algunos factores que pueden causar daño irreversible en el DNA del gameto masculino que se describen a continuación.

- Generación de radicales libres de oxígeno o estrés oxidativo (Zini et al., 2001; Aitken and Krausz, 2001).
- Empaquetamiento anormal de la cromatina (Manicardi et al., 1995; Sakkas et al., 1999).
- Deficiencias en la recombinación (Agarwal and Allamaneni, 2004).

- Apoptosis abortiva originada por fallo en la apoptosis de células germinales testiculares durante la espermatogénesis. De esta manera la subsiguiente población de espermatozoides puede presentar anomalías, representativas de células en apoptosis, tras la salida de los espermatozoides al túbulo seminífero.
- Causas externas que provocan o potencian los efectos anteriores: determinadas condiciones ambientales (contaminación, tabaquismo, temperatura testicular elevada), patológicas (criptorquidia, varicocele, procesos inflamatorios o infección del tracto genital, cáncer, episodios febriles, estrés).

3.2.2 Condensación del DNA espermático

Durante la espermatogénesis ocurren cambios fundamentales en la estructura y composición de la cromatina espermática. Así, el núcleo haploide se condensa durante la transformación de las espermátidas redondas en alargadas. Esta transformación estructural del núcleo de las espermátidas corresponde temporalmente con cambios en la composición de las proteínas básicas cromosómicas. Estudios en numerosas especies han mostrado que las histonas son eliminadas y reemplazadas por pequeñas proteínas básicas de transición durante el período en que comienza la condensación nuclear, y la cromatina empieza a organizarse en fibrillas laxas (Ammer et al., 1986; Gusse et al., 1986; Balhorn et al., 1987). Sin embargo, estas proteínas están presentes sólo en un corto período de la espermatogénesis, siendo reemplazadas por protaminas (Kasinsky, 1989; Oliva and Dixon, 1991).

Esta condensación de la cromatina durante la espermatogénesis unida al transporte epididimario y a la descondensación de la cromatina en el momento de la fecundación son esenciales para una fecundación exitosa. El objetivo del proceso de la condensación es reducir el volumen de la cromatina para evitar su degradación enzimática por nucleasas o agentes físico-químicos, con la consiguiente protección de la información genética.

Determinar el grado de condensación de la cromatina espermática es arduo debido a que se trata de un proceso dinámico y progresivo (Kvist et al., 1980; Kvist et al., 1988) por lo que la cuantificación de la misma es subjetiva en función del tiempo (Huret, 1983). Es importante diferenciar dos conceptos: condensación y estabilidad. El primero hace referencia al estado de empaquetamiento de la cromatina espermática tras la eyaculación. Y el segundo concepto, la estabilidad, hace referencia a la resistencia de la cromatina espermática a la descondensación tras tratamiento con diferentes agentes reactivos descondensantes (SDS, EDTA, DTT, albúmina, heparina y diversas enzimas).

Para evaluar la condensación o la estabilidad de la cromatina espermática se pueden utilizar el microscopio óptico, microscopio electrónico o técnicas fluorescentes utilizando el microscopio de fluorescencia o citometría de flujo.

- Microscopio óptico. Se evalúa el grado de hinchamiento que presentan las cabezas de los espermatozoides en función de la descondensación que han sufrido. La evaluación de la resistencia que presenta la cromatina a la descondensación se puede realizar también mediante tinción del núcleo

espermático (azul de toluidina, azul de anilina, tinción de Feulgen o fluorocromos).

- Microscopio electrónico. Se trata de un análisis ultramorfológico de las células espermáticas mediante microscopía de barrido. Existe correlación entre la estabilidad de la cromatina espermática y la morfología de la cabeza del espermatozoide, asociándose las formas hipoelongadas a espermatozoides con una cromatina menos estable.
- Técnicas fluorescentes. Los fluorocromos más comúnmente usados en el estudio de la cromatina del espermatozoide humano son: naranja de acridina (Munné and Estop, 1993), bromuro de etidio (Neg. et al., 1992), yoduro de propidio (Hirsh et al., 1992), DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol-HCl) (Spano et al., 1984), mitramicina (Engh et al., 1992) y monobromobimane (Kosower et al., 1992). En general se puede afirmar que a mayor condensación y estabilidad de la cromatina espermática menor accesibilidad del fluorocromo (Molina et al., 1995; Molina et al., 2001).

3.2.3 Fragmentación del DNA espermático

La transmisión de la molécula de DNA íntegra e intacta desde el espermatozoide hasta el ovocito es esencial para la consecución y desarrollo del embarazo. Asimismo, la fragmentación del DNA espermático podría conllevar alteraciones en la fecundación y el desarrollo embrionario consiguiente. Por ello, en los últimos años también se está barajando como causa probable de esterilidad el daño en la

integridad del DNA espermático y, de ahí, el interés en desarrollar técnicas analíticas encaminadas a medir la fragmentación del DNA espermático.

Las técnicas para el estudio de la fragmentación del DNA espermático se pueden dividir en dos grupos. En primer lugar se encuentran aquellas que miden la susceptibilidad diferencial del DNA para ser desnaturalizado por diversos tratamientos.

- Test de la estructura de la cromatina espermática (SCSA o Sperm Chromatin Structure Assay) (Evenson et al, 1999).
- DBD-FISH o DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (Fernández et al., 2000).
- SCD o Sperm Chromatin Dispersion (Fernández et al., 2003).
- Ensayo cometa (Singh et al., 1988).

Y en el segundo grupo se incluyen aquellas que marcan las roturas en la cadena de DNA porque incorporan moléculas marcadas con fluorocromos en el extremo de rotura.

- TUNEL o Terminal dUTP Nick-End Labeling (Lopes et al., 1998).
- ISNT o In Situ Nick Translation (Gorczyca et al., 1993).

3.2.3.1 SCSA

El SCSA posibilita la cuantificación del nivel de roturas presentes en el DNA a través del índice de fragmentación del DNA (DFI). Mediante esta técnica se desnaturaliza la molécula de DNA con una solución ácida, y posteriormente se tiñe con naranja de acridina. Cuando este

fluorocromo se intercala entre la doble hélice del DNA emite a una longitud de onda de 530 nm al ser excitado y se visualiza de color verde. En cambio, cuando se intercala en el DNA de cadena sencilla emite a una longitud de onda de 640 nm (color rojo). El DNA fragmentado, que es más susceptible a ser desnaturalizado, se visualizará en color rojo. Las células se separan por citometría de flujo.

Este test es actualmente el más usado en clínica, tanto en estudios in vitro como en estudios in vivo (Björndahl et al., 2010).

3.2.3.2 SCD

Se realiza tratamiento ácido seguido de desproteinización, de manera que los espermatozoides con DNA fragmentado liberan grandes bucles de DNA generando halos de dispersión de la cromatina identificables al microscopio óptico. En cambio, este efecto no se produce cuando el DNA del espermatozoide no está fragmentado.

3.2.3.3 Ensayo cometa

El ensayo cometa se lleva a cabo incluyendo los espermatozoides en un microgel de agarosa situado sobre un portaobjetos, y sometidos a una lisis mediante un agente reductor de grupos sulfhidrilo de las protaminas. Los núcleos desproteinizados se someten a electroforesis y se tiñen con sustancias fluorescentes. El DNA fragmentado avanza por acción del campo eléctrico generando una imagen similar a la cola de un cometa. Los espermatozoides que no presentan fragmentación no generan esta imagen.

3.2.3.4 TUNEL

El TUNEL consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con fluorocromos en los extremos 3'-OH de roturas existentes en el DNA, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se lleva a cabo mediante la transferasa terminal (Deoxinucleotidyl Transferase o TdT). La señal es mayor cuanto mayor sea el grado de fragmentación del DNA.

3.2.3.5 Evaluación de la fragmentación del DNA

La evaluación de la fragmentación del DNA en el espermatozoide ha sido recomendada por algunos autores como un test complementario avanzado en el estudio de las parejas estériles (Saleh et al., 2002; Saleh et al., 2003; Evenson and Wixon, 2008), especialmente en el sentido de elegir la técnica de reproducción asistida más apropiada (Erenpreiss et al., 2006). No obstante, otros autores han sugerido que esta investigación debe ser introducida como un test de rutina en el estudio básico de esterilidad, basándose en la observación de que una proporción significativa de varones con CSP normales tienen altos niveles de alteración en la integridad de su DNA (Erenpreiss *et al.*, 2008; Nicopoullos *et al.*, 2008). Sin embargo antes de introducir cualquier test diagnóstico en la práctica clínica, su validez clínica debe ser comparada con la de aquellos métodos ya existentes (Bossuyt *et al.*, 2000; buscar ref Barratt et al., 2010).

4. Tests de selección embrionaria en el tratamiento de la pareja estéril

El éxito de las técnicas de reproducción asistida (TRA) depende de maximizar la eficiencia en cada uno de los pasos que comprenden todo el

proceso y, en este sentido, la evaluación de la calidad embrionaria es clave en la etapa del laboratorio de embriología, ya que afecta a la decisión de cuántos y qué embriones transferir. Ésto está directamente relacionado con la eficacia de un ciclo de FIV y con la probabilidad de embarazo múltiple. Esta selección se puede realizar mediante diversos criterios: morfológicos, cromosómicos o metabólicos.

4.1 Selección embrionaria mediante morfología embrionaria

4.2 Evaluación ovocitaria

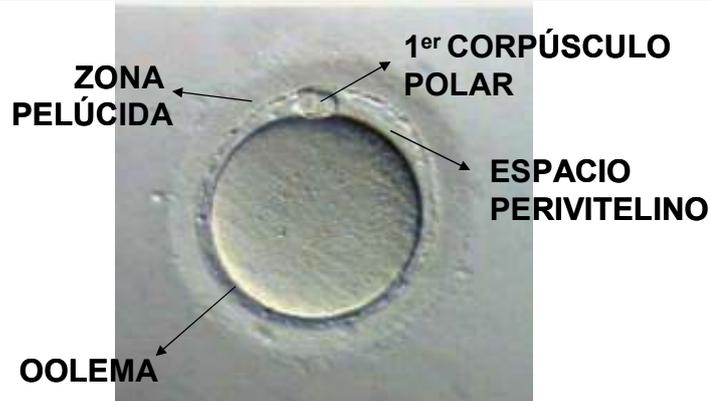
La valoración de la calidad ovocitaria se realiza mediante la evaluación de aspectos morfológicos del ovocito previo a la realización de la ICSI y su correlación con el resultado del ciclo de tratamiento.

Los ovocitos recuperados de pacientes sometidas a tratamiento de estimulación ovárica para realizar TRA pueden encontrarse en diferentes etapas del desarrollo meiótico. Sólo los ovocitos que se encuentran en el estadio celular de metafase II (morfológicamente se observa que ha extruido el primer corpúsculo polar) son utilizados para ICSI. En cambio, los ovocitos en fase celular metafase I (morfológicamente no se observa el primer corpúsculo polar extruido) o profase I (morfológicamente muestra una vesícula germinal) no pueden ser utilizados para ICSI. Además, los ovocitos metafase II gigantes (diámetro mayor a 200µm) serán descartados para la ICSI, ya que suelen resultar en fecundaciones anómalas: diginia y triploidía (Balakier and Cadesky, 1997).

Los ovocitos en metafase II de buena morfología presentan un citoplasma claro, con una granulosidad moderada, un pequeño espacio

perivitelino, un corpúsculo polar intacto y una zona pelúcida sin color (Figura 5).

Figura 5. Esquema de un ovocito en metafase II con buena morfología.



Sin embargo, más de la mitad de los ovocitos recuperados en un ciclo de FIV/ICSI muestran por lo menos una anomalía morfológica. Estas anomalías se pueden subdividir en anomalías citoplasmáticas o extracitoplasmáticas. Las primeras incluyen granulosidad o decoloración del citoplasma, agregación del retículo endoplásmico liso, vacuolización y presencia de incorporaciones en el citoplasma como cuerpos refringentes: cuerpos necróticos o picnóticos. Estas anomalías reflejarían defectos intrínsecos del ovocito en detrimento de su viabilidad. Las segundas incluyen irregularidades en la forma del ovocito, espacio perivitelino aumentado, presencia de restos en el espacio perivitelino, fragmentación del primer corpúsculo polar, así como consistencia anormal del oolema y de la zona pelúcida. Algunos de estos defectos se han asociado con una disminución de la tasa de supervivencia del ovocito tras la ICSI, pero no con la fecundación y calidad embrionaria.

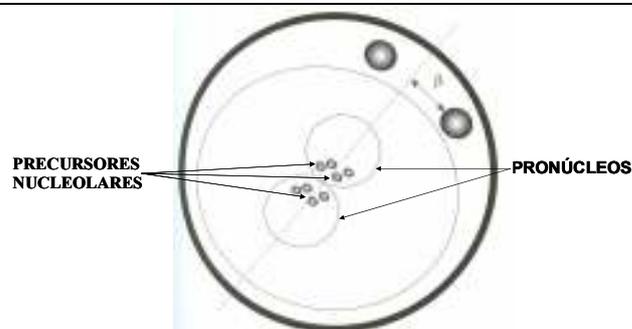
Serhal et al. (1997) y Loutradis et al. (1999) reportaron mayores tasas de embarazo en pacientes con transferencia de embriones procedentes de ovocitos normales frente a pacientes con transferencia de embriones procedentes de ovocitos con anomalías citoplasmáticas. Kaharaman et al. (2000) encontraron menores tasas de embarazo a término en pacientes con ovocitos con citoplasma granuloso, y Alikani et al. (1995) observaron una disminución significativa en la pérdida preclínica de embarazo en pacientes con transferencias de embriones procedentes de ovocitos de buena morfología.

Actualmente, a excepción de los megaovocitos, no se suele considerar la calidad ovocitaria en la selección embrionaria, pues no todos los autores han observado las comentadas asociaciones entre morfología ovocitaria y embrionaria (De Sutter et al., 1996).

4.1.2 Evaluación del cigoto

La valoración del cigoto se realiza mediante la evaluación de parámetros morfológicos de los pronúcleos masculino y femenino, así como de sus precursores nucleolares tras 16-18 horas post inseminación mediante FIV o ICSI (Figura 6).

Figura 6. Esquema de un cigoto.



Los acontecimientos que se han podido observar en el ovocito tras una fecundación normal mediante ICSI se describen a continuación. Tras realizar la ICSI el ovocito muestra “ondas” circulares de granulación en el ooplasma con una periodicidad de 20 a 53 minutos. Durante esta fase de granulación la cromatina del espermatozoide se descondensa. A continuación el segundo corpúsculo polar es extruido y el pronúcleo masculino se forma en la zona central del ovocito. Acto seguido se forma el pronúcleo femenino que migra hacia la zona central del ovocito para encontrarse con el pronúcleo masculino. Ambos pronúcleos aumentan su tamaño y los precursores nucleolares se desplazan por el interior de cada pronúcleo para alinearse y quedar enfrentados.

Los pronúcleos se clasifican en base a la simetría, posición y localización de los mismos. Y los precursores nucleolares se evalúan en base al número, simetría y localización de los mismos. Otras características observadas para la clasificación del cigoto son la morfología y alineamiento de los corpúsculos polares, la morfología del citoplasma (presencia vs. ausencia de halo citoplasmático) y finalmente una segunda evaluación embrionaria 25-27 horas post-inseminación para evaluar la presencia o ausencia de los pronúcleos y/o la división temprana.

Sadowy et al. (1998) encontraron una fuerte correlación entre mosaicismo embrionario y cigoto con pronúcleos de diferente tamaño. Por otro lado, diferentes autores encuentran que el desarrollo del embrión en etapas tempranas puede verse afectado cuando se produce asincronía en la formación y polarización de los precursores nucleolares (Van Blerkom, 1990; Tesarik and Greco, 1999; Scott et al., 2000).

El alineamiento de los pronúcleos y los corpúsculos polares está relacionado con el eje polar de la primera división embrionaria, pudiendo

producirse anomalías cromosómicas en el desarrollo embrionario si el alineamiento es incorrecto (Garello et al., 1999).

La presencia de halo citoplasmático se produce por la redistribución de las mitocondrias alrededor de los pronúcleos, originando un anillo claro en la periferia del ooplasma. Diferentes publicaciones concluyen que la presencia de halo es una característica positiva, siempre y cuando no sea excesiva (Balaban and Urman, 2006; Payne et al., 1997; Samulets et al., 2001; Zollner et al., 2002). No obstante, esta característica corresponde a un proceso dinámico que puede no observarse en el cigoto en el momento de su evaluación, por lo que otros autores no consideran que sea un parámetro a tener en cuenta en la evaluación del cigoto (Paine, 1997).

Los estudios que evalúan la división temprana a las 25-27 horas post-inseminación, intentan correlacionar este parámetro con la morfología embrionaria (Ciray et al., 2006; Lundin et al., 2000), el desarrollo a blastocisto (Neuber et al., 2003), la viabilidad embrionaria (Salumets et al., 2003; Shoukir et al., 1997) y la tasa de implantación (Ciray et al., 2006; Rienzi et al., 2005), pero sus conclusiones son contradictorias.

Numerosos sistemas de gradación pronuclear han sido propuestos (Scott and Smith, Tesarik and Greco, Ludwig et al, Zollner et al o Senn et al.), pero actualmente no está en uso ningún sistema estandarizado para la gradación del cigoto, ya que aunque el desarrollo pronuclear es un proceso dinámico y excluir un embrión basándose en una observación puntual puede llevar a errores (James et al., 2006). Por ello, la selección embrionaria será el resultado de la evaluación conjunta del embrión: desde el estadio de cigoto hasta el día de la transferencia.

4.1.3 Evaluación del embrión

La valoración morfológica del preembión ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria. Para realizar esta valoración el embrión se observa en el intervalo de 44-47 horas post inseminación (día+2) y 67-71 post inseminación (día+3).

Los criterios más utilizados para seleccionar el número óptimo de embriones a transferir y reducir la incidencia de embarazo múltiple son: número de células, simetría celular, sincronía de división celular, porcentaje y tipo de fragmentación celular, visualización de núcleos y grado de multinucleación.

Número de células y ritmo de división

El número de células que se pueden observar en el embrión en estadio de d+2 y d+3 corresponden a la cinética de división embrionaria, cuyos valores esperados en cada momento del cultivo embrionario quedan reflejados en la figura 7.

Figura 7. Cinética de división embrionaria esperada en FIV

Ovocito	
Cigoto	—————→ 16-19 horas post-inseminación
Borran pronúcleos	———→ 20-23 horas post-inseminación
División temprana	———→ 25-27 horas post-inseminación
D+2	—————→ 44-47 horas post-inseminación
D+3	—————→ 67-71 horas post-inseminación
D+4	—————→ 94-98 horas post-inseminación
D+5	—————→ 112-120 horas post-inseminación
D+6	—————→ 136-140 horas post-inseminación

Fragmentación

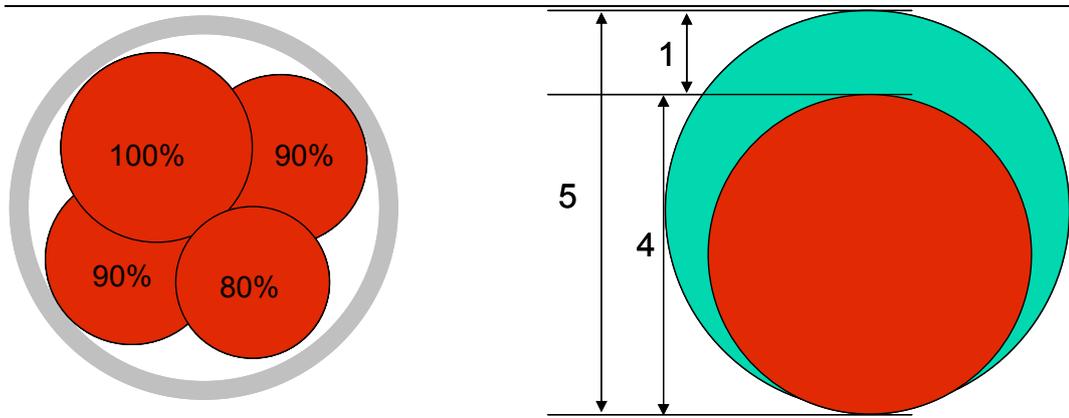
Es necesario evaluar el grado de fragmentación, el tamaño y la distribución de los fragmentos. Respecto al grado de fragmentación, éste puede oscilar entre 0 y 100%, no repercutiendo en la tasa de implantación si es inferior al 20-25% (Hardarson et al., 2001; Van Royen et al., 1999; Ziebe et al., 1997; Alikani et al., 2000; Racowsky et al., 2003). En lo que respecta al tamaño y distribución de los fragmentos, son los de gran tamaño y los repartidos por todo el embrión los que mayor influencia negativa tienen sobre la tasa de implantación (Alikani and Cohen, 1995; Alikani et al., 2000).

Simetría celular

El tamaño de las blastómeras también es un factor útil para estudiar el potencial de desarrollo e implantación de los embriones (Hardarson et al., 2001). Una división desigual origina blastómeras de diferente tamaño con distinta distribución del material genético, lo cual repercute negativamente en el potencial de implantación (De Placido et al., 2002; Hnida et al., 2004; Steer et al., 1992; Van Blerkom et al., 2000; Veek et al., 1999a). Según Hardarson et al. (2001), un preembrión de 4 células con división asimétrica es aquel en el que la diferencia entre el diámetro de las blastómeras mayor y menor supera el 20%.

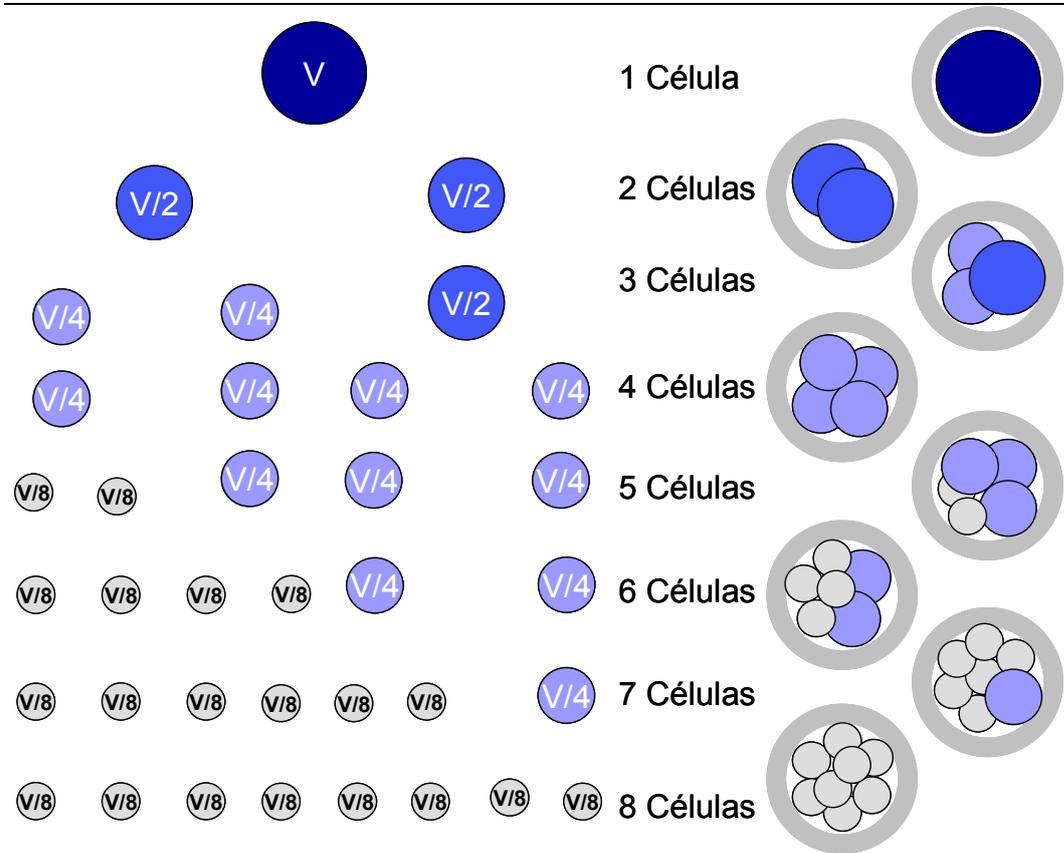
En la figura 8 se muestra un esquema de un embrión que presenta asimetría entre sus blastómeras.

Figura 8. Asimetría en la división celular embrionaria.



No obstante, a veces la asimetría entre blastómeras puede ser normal, pues se debe una asincronía en la división celular. En la figura 9 se muestra la asimetría embrionaria que corresponde con asincronía en la división celular para embriones en día+2 y día+3 (Holte et al., 2007; Roux et al., 1995).

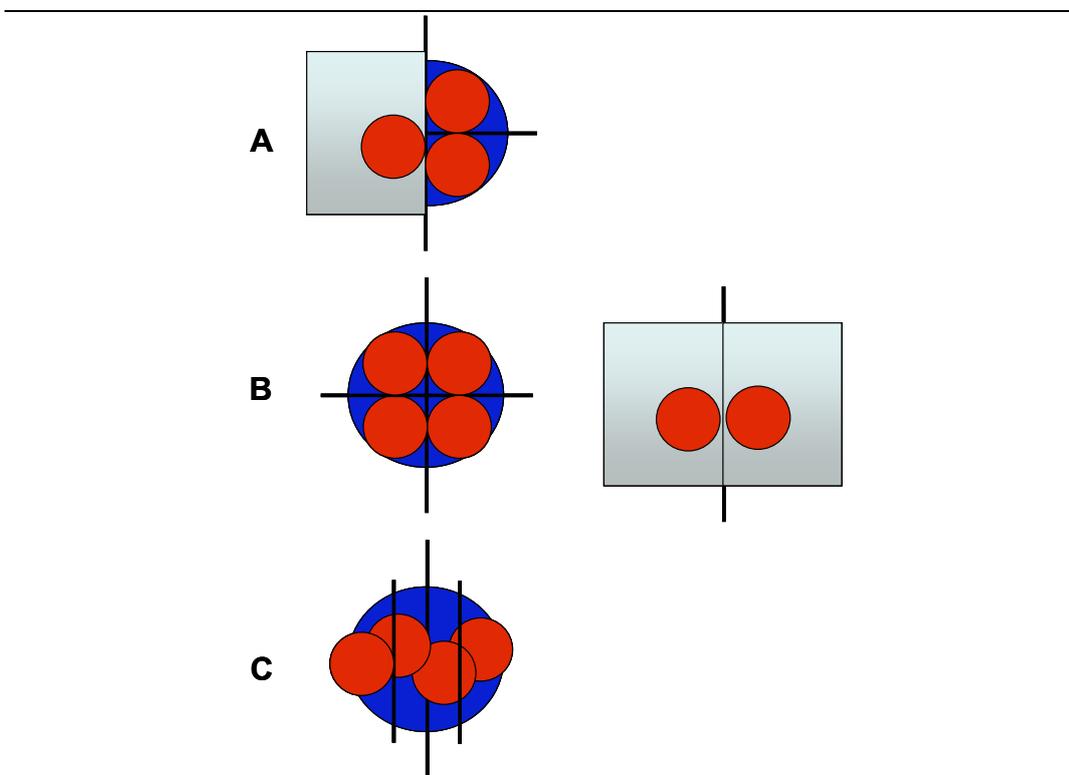
Figura 9. Embriones con asimetría entre sus blastómeras por asincronía en la división celular.



Es necesario saber distinguir una blastómera de un resto citoplasmático. Johansson et al. (2003) determinó el diámetro normal de las blastómeras, resultando de 65-70 μ en día 2 y algo menor en día 3 (55-60 μ). El diámetro límite por debajo del cual consideraron resto citoplasmático, ya que los “fragmentos” analizados no mostraron material genético, fue 45 μ en día+2 y 40 μ en día+3.

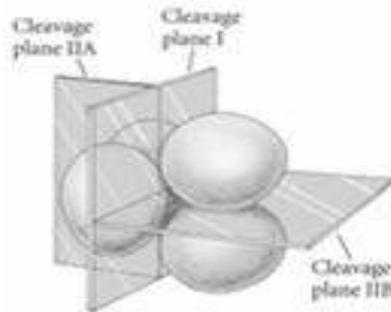
Otro aspecto de la división celular que se puede evaluar en el embrión en día+2 es el plano de división de las blastómeras. El embrión presentará una determinada disposición de las blastómeras en función de la orientación de los planos de división para pasar de 2 a 4 blastómeras (Figura 10).

Figura 10. Planos de división embrionaria.



Holte et al. (2007) encuentra mayores tasa de implantación cuando estos planos de división son perpendiculares entre si, como se muestra en la figura 11 y en la imagen 0 de la figura anterior.

Figura 11. Planos de división perpendiculares entre sí en la formación del preembrión de 4 células.



Visualización de núcleos y grado de multinucleación

La presencia de dos o más núcleos o de micronúcleos en una célula tiene una correlación directa con el incremento en la tasa de anomalías cromosómicas embrionarias (Hardarson et al., 2001). La presencia de blastómeras multinucleadas implica baja tasa de implantación y aumento en la tasa de aborto (Jackson et al., 1998; Meriano et al., 2004; Pelinck et al., 1998; Van Royen et al., 2003).

Sistemas de clasificación en evaluación embrionaria

Numerosos sistemas de clasificación embrionaria han sido creados teniendo en cuenta diversos aspectos de los comentados anteriormente, con la finalidad de seleccionar para la transferencia embrionaria los embriones con mayor potencial de implantación (Brinsden et al., 1999; Giorgetti et al., 1995; Staessen et al., 1992; Bras et al., 1996; Veek et al., 1999; Rijnders et al., 1998; Alikani et al., 1999; Antczak et al., 1999; Hill et al., 1989; Steer et al., 1992). Sin embargo, aunque existe cierto acuerdo

sobre qué es un buen preembrión y qué es un mal preembrión, la ausencia de criterios comunes afecta tanto a los parámetros a evaluar como a los puntos de corte entre categorías.

Con la intención de unificar criterios de evaluación embrionaria la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) ha desarrollado un sistema de gradación de la calidad embrionaria para las transferencias en día 2 y 3 de desarrollo embrionario (ASEBIR 2008). En las figuras 12 y 13 se muestran los esquemas de esta clasificación morfológica para transferencias en día+2 y día+3.

Figura 12. Calidad embrionaria en día+2 según ASEBIR.

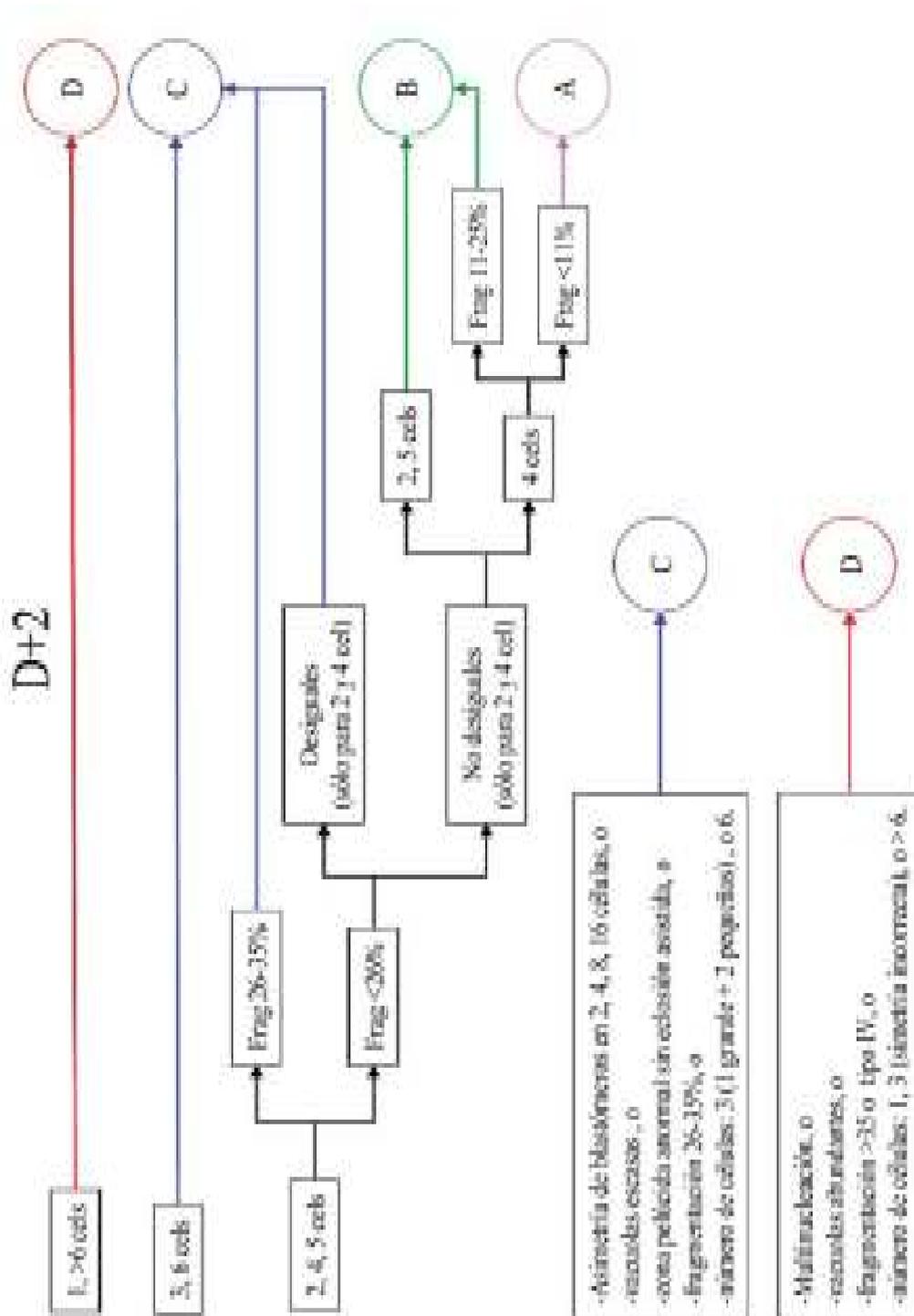
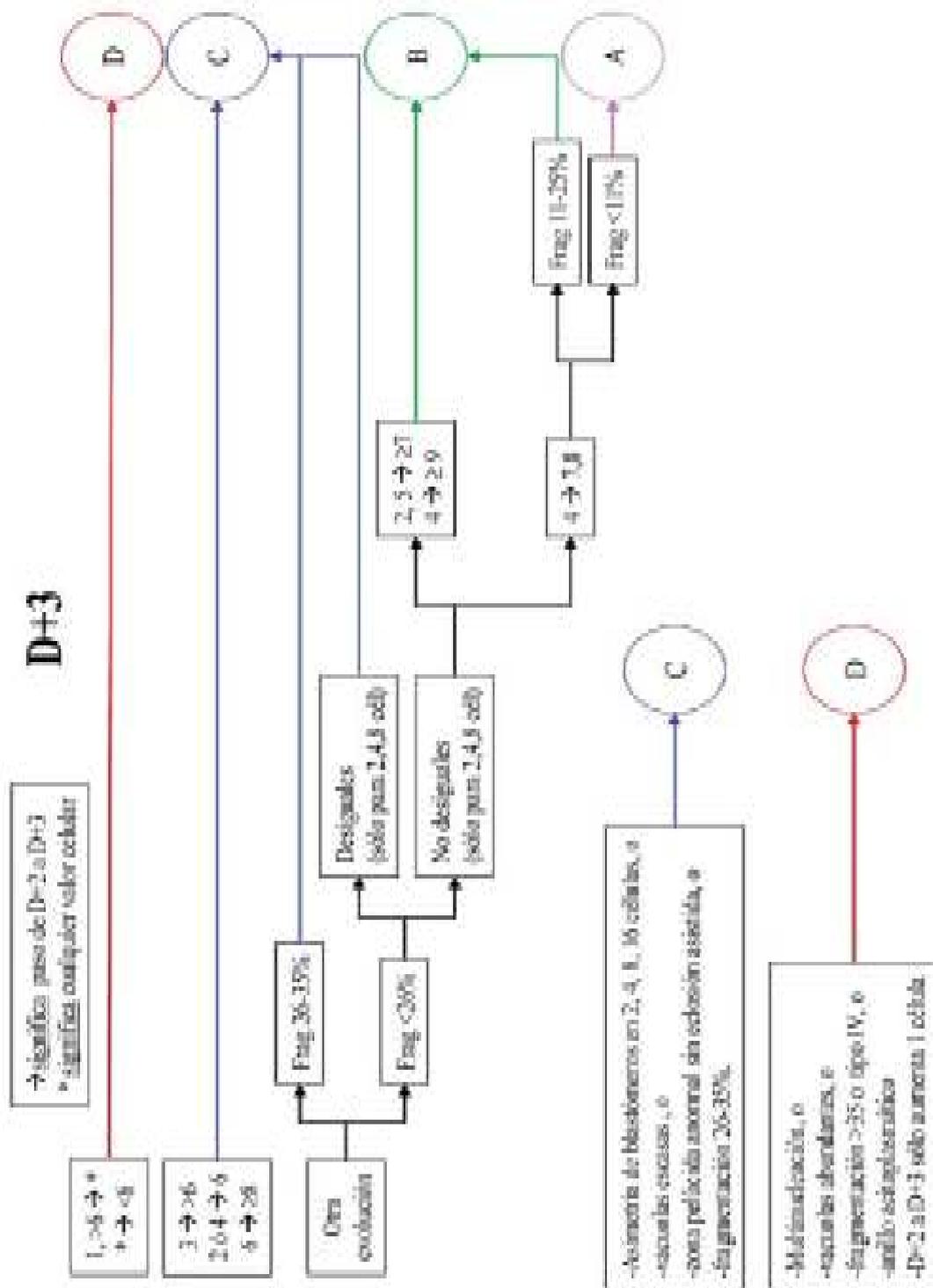


Figura 13. Calidad embrionaria en día+3 según ASEBIR.



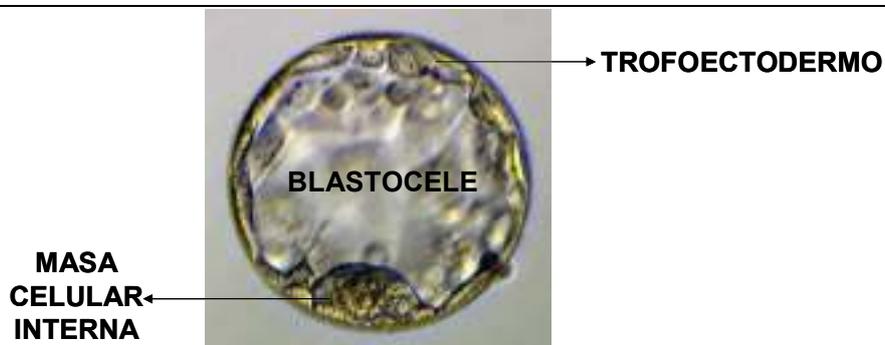
4.1.4 Evaluación del blastocisto

El cultivo secuencial de embriones hasta estadio de blastocisto en día+4 o día+5 de desarrollo es una técnica no-invasiva de selección embrionaria que puede contribuir a una mejor selección.

El desarrollo embrionario se encuentra sujeto a los transcritos de origen materno hasta día+3 de desarrollo, momento a partir del que se activa el genoma embrionario. Únicamente cultivando los embriones hasta estadio de blastocisto podremos identificar aquellos embriones con bloqueo de desarrollo en día+3.

El estado del embrión en día 5 ó 6 de desarrollo puede variar desde una etapa más retardada de compactación hasta una etapa más avanzada de blastocisto expandido. La calidad de este último se determina por la formación de una cavidad diferenciada rellena de líquido (blastocele), las capas de células circulares externas que rodean a esta cavidad (trofoectodermo) y el conjunto de células internas que conforman las células de la masa interna (CMI) (Figura 14), cuyo tamaño ha sido considerado el factor más importante para una implantación exitosa.

Figura 14. Esquema del blastocisto expandido.



Al igual que para embriones en día 2 y 3 de desarrollo, ASEBIR ha publicado un sistema de gradación de embriones en día 5 y 6 (Figuras 15).

Figura 15. Calidad embrionaria día+5 y día+6 según ASEBIR.

CALIDAD	Organización en blastocisto	Zona pelúcida	MCI	Tamaño MCI *	trofoctodermo	Grado de expansión **
Blastocisto A	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800 μm^2 - 1900 μm^2	Epitelio homogéneo Células elípticas	El blastocelo ocupa todo el volumen del preembrión
Blastocisto B	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800 μm^2 - 1900 μm^2	Epitelio irregular	
Blastocisto C	En D+6			< 1900 μm^2	Epitelio homogéneo Células elípticas	
Blastocisto D	En D+6			< 1900 μm^2	Epitelio irregular Células escasas	

* 3.800 μm^2 es comparable al tamaño de un blastómero de un preembrión en estadio de 4 células.

** Blastocisto colapsado: es un mecanismo natural que tiene lugar en el estadio de blastocisto y que, si ocurre, habrá que observarlo de nuevo. No hará cambiar la categoría asignada al preembrión.

Tabla VI. Tabla de asignación de la calidad del blastocisto en función de las variables consideradas.

4.2 Selección embrionaria mediante diagnóstico genético preimplantacional con screening de aneuploidías

En un ciclo de PGS la pareja debe someterse primero a un tratamiento de FIV. Tras realizar dicha técnica, como se ha comentado anteriormente, se obtienen embriones “in vitro” y se lleva a cabo la biopsia embrionaria de una o varias blastómeras por embrión. El momento idóneo para realizar la biopsia es cuando los embriones tienen entre 6 y 8 células (en día 3 de desarrollo embrionario), y la rotura de la zona pelúcida se puede realizar con métodos mecánico, químico o sistemas láser infrarrojos.

- Mecánico: el embrión se sujeta con la micropipeta “holding” y la zona pelúcida es traspasada tangencialmente con una micropipeta. El embrión se libera entonces de la micropipeta holding y la parte de la zona pelúcida ensartada se fricciona contra dicha pipeta hasta que se consigue un hendidura.
- Químico: se disuelve la zona pelúcida utilizando ácido Tyrode y se obtiene un orificio de 30-35 μm en la misma.
- Sistemas láser infrarrojos: el rayo láser es liberado a través del objetivo del microscopio, produciéndose una rotura térmica provocada por la absorción de la energía del láser por la zona pelúcida. La absorción de la radiación por la placa y el medio de cultivo son mínimas. Uno de los últimos sistemas desarrollados es el láser de diodo de infrarrojos, con el que el efecto en la zona pelúcida es muy

localizado y los orificios son redondos y precisos, reduciéndose mucho el tiempo de exposición.

Una vez realizada la apertura de la zona pelúcida, se procede a biopsiar una o dos blastómeras en las que se observe un núcleo visible. Los embriones se colocan en microgotas de un medio tamponado libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} con el objetivo de inhibir las uniones entre blastómeras y facilitar la extracción de una o dos células.

4.2.1 Hibridación in situ fluorescente

Las blastómeras biopsiadas se fijan para ser analizadas mediante hibridación in situ fluorescente (FISH). Esta técnica molecular permite localizar un determinado fragmento de la secuencia de los ácidos nucleicos y pone de manifiesto la presencia o ausencia de secuencias génicas específicas. Utiliza sondas de DNA marcadas con moléculas fluorescentes que se unen específicamente a secuencias de ácidos nucleicos de un cromosoma. De este modo se pueden enumerar las copias de un determinado cromosoma presente en el núcleo de la blastómera en interfase, por tanto podemos detectar anomalías cromosómicas numéricas sin necesidad de tener células en metafase.

Las sondas utilizadas en núcleos interfásicos pueden ir dirigidas a diferentes tipos de secuencias de DNA:

- Secuencias centroméricas: secuencias de DNA satélite (150-300 pares de bases) altamente repetitivas y específicas, localizadas habitualmente en el centro del cromosoma.

- Secuencias específicas de locus: secuencia de DNA de copia única (200-400 kilobases) o un número reducido de copias, específicas de genes o loci génicos.
- Secuencias subteloméricas: secuencias de DNA de copia única, específicas y localizadas en extremos terminales de cada cromosoma (60-175 kilobases).

Para localizar las secuencias de interés la sonda debe hibridar con la secuencia de DNA de la muestra. El primer paso consiste en desnaturalizar las moléculas de DNA (separar las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del DNA), tanto la de la sonda como la de la muestra de estudio. A continuación, se hibrida la sonda con su región complementaria del DNA de la muestra, y por complementariedad de las bases se une la sonda de interés con la región complementaria del DNA de la muestra. Con un microscopio de fluorescencia se observan las señales de la sonda.

El número de cromosomas que pueden ser evaluados mediante FISH es reducido (de 9 a 11 cromosomas en la actualidad), de manera que se analizarán aquellos seleccionados de acuerdo con la historia clínica de la pareja y aquellos involucrados en las aneuploidías más comunes relacionadas con abortos espontáneos.

4.2.2 Hibridación genómica comparada

La hibridación genómica comparada (CGH) se utiliza para examinar el número de copias en la secuencia de DNA. Con esta técnica se hibridan simultáneamente 2 muestras de DNA genómico previamente marcado con diferentes fluorocromos, con cromosomas normales en metafase (en presencia de DNA Cot-1 para bloquear las secuencias repetitivas). La muestra a estudiar se marca normalmente con un

fluorocromo fluorescente verde, y la muestra de referencia (DNA normal) se marca con fluorocromo rojo. La cinética de hibridación del DNA es proporcional al número de copias de la secuencia para un locus específico. A continuación, se utiliza microscopía de fluorescencia y procesador digital de la imagen, de manera que el ratio de ambas muestras, estudio y referencia, se mide a lo largo de los ejes cromosómicos. Las desviaciones del ratio normal (1.0), en determinadas regiones cromosómicas, representa ganancia (verde) o pérdida (rojo) de material genético. La figura xxx muestra un esquema general de la técnica CGH.

Cuando se realiza la CGH para una única célula (la blastómera embrionaria biopsiada) el DNA total de esta célula se amplifica mediante reacción en cadena de la polimera (PCR). El producto de esta PCR se marca como se ha indicado anteriormente para la muestra de estudio. El DNA referencia (DNA normal) también se amplifica, e igualmente el producto se marca como se comentó anteriormente para la muestra de referencia.

El éxito del procedimiento depende en gran medida de una amplificación eficiente del DNA de la blastómera biopsiada así como de una hibridación efectiva del DNA con los cromosomas en metafase (Wilton and Voullaire, 2005).

5. Evaluación de tests diagnósticos

El diagnóstico juega un papel central en la actividad clínica. Tanto es así, que la habilidad para realizar un diagnóstico constituye una de las cualidades más valoradas por los propios clínicos. Los tests diagnósticos son una herramienta fundamental para conseguirlo, y éstos deben ser evaluados correctamente antes de ser introducidos en la práctica diaria.

Para evaluar un test diagnóstico es necesario comprender los parámetros que lo definen.

5.1 Validez diagnóstica

5.1.1 Tabla 2x2

La situación más simple se da cuando el resultado del test tiene dos posibilidades: normal o anormal. En estas condiciones podemos representar los resultados de aplicar el test a un grupo de individuos en una tabla 2x2 (Figura 16). De esta forma clasificamos a los pacientes en las 4 categorías que se citana a cotinuación.

- Verdaderos Positivos (a)
- Falsos Positivos (b)
- Falsos Negativos (c)
- Verdaderos Negativos (d)

Figura 16. Tabla 2x2

		Gold Standard	
		Presencia de Enfermedad o Alteración	Ausencia de Enfermedad o Alteración
Test	Anormal (+)	VP	FP
	Normal (-)	FN	VN

VP, verdadero positivo; FP, falso positivo; FN, falso negativo; VN, verdadero negativo.

Un test perfecto sería aquel que no tuviera falsos positivos ni falsos negativos. Con estas características un test respondería dando un resultado positivo ante la presencia de enfermedad y un resultado negativo ante la ausencia de enfermedad. Desgraciadamente la mayoría de tests diagnósticos son imperfectos, de tal manera que el test puede dejar de responder cuando existe enfermedad y responder en ausencia de ésta.

Al presentar los resultados de esta forma realmente estamos comparando el test con la prueba de referencia (prueba de oro o “Gold Standard”), que nos informa del verdadero estado del individuo. La elección de la prueba de referencia constituye un punto clave de la evaluación de una prueba diagnóstica.

De esta estructura de evaluación diagnóstica se desprenden importantes consecuencias. En primer lugar un nuevo test sólo tienen sentido si es más seguro, cómodo y barato que la prueba de referencia. En caso contrario, es preferible seguir utilizando la prueba de referencia.

En segundo lugar, y de acuerdo con este enfoque, ningún test puede ser mejor que su prueba de referencia, lo máximo que puede aspirar es a ser igual.

A partir de los datos de la tabla 2x2 se pueden calcular directamente algunos parámetros de interés que se detallan a continuación.

5.1.2 Probabilidad pre-test o Prevalencia

La probabilidad de que el sujeto esté enfermo antes de realizar la prueba, se conoce como probabilidad pre-test o prevalencia. Solo en el caso de que la proporción de enfermos de la tabla 2x2 sea real, el valor de la prevalencia se puede calcular a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{(a + c)}{(a + b + c + d)} = \frac{(VP + FN)}{(VP + FP + FN + VN)}$$

Esta situación no suele ser la situación real de la prevalencia de la enfermedad, en cuyo caso debe ser el clínico el que establezca dicho valor.

5.1.3 Sensibilidad y Especificidad

La sensibilidad (o tasa de verdaderos positivos) es la proporción de enfermos en los que el test es positivo. Dicho de otra forma, la sensibilidad es la probabilidad de que el test sea positivo, condicionada a que el individuo es realmente un enfermo. Se calcula de la siguiente manera.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{(a + c)} = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

La sensibilidad indica la capacidad del test para detectar casos. Un test muy sensible es, por tanto, un test con pocos falsos negativos. Los tests muy sensibles son especialmente útiles para descartar la presencia de enfermedad (la regla mnemotécnica adaptada del inglés, Snou-out, es Sensible-Out: sensibles descartan).

La especificidad (o tasa de verdaderos negativos) es la proporción de no enfermos en los que el test es negativo. Expresado en términos de probabilidad condicional, la especificidad es la probabilidad de que el test sea negativo, condicionado a que el individuo no tenga la enfermedad. Se calcula a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{(b + d)} = \frac{VN}{(VN + FP)}$$

La especificidad indica la capacidad de detectar no enfermos. Un test muy específico es, por tanto, un test con pocos falsos positivos. Estos tests son especialmente útiles para confirmar la presencia de la enfermedad (el acrónimo adaptado del inglés, Spin-in, es Específico-In: Específicos confirman).

Frecuentemente, en lugar de la sensibilidad o especificidad se utilizan sus complementarios, es decir, la tasa de falsos negativos (proporción de enfermos en los que el test es negativo) o falsos positivos respectivamente (proporción de no enfermos en los que el test es positivo).

$$\text{Tasa de falsos positivos} = \frac{b}{(b + d)} = \frac{FP}{(FP + VN)}$$

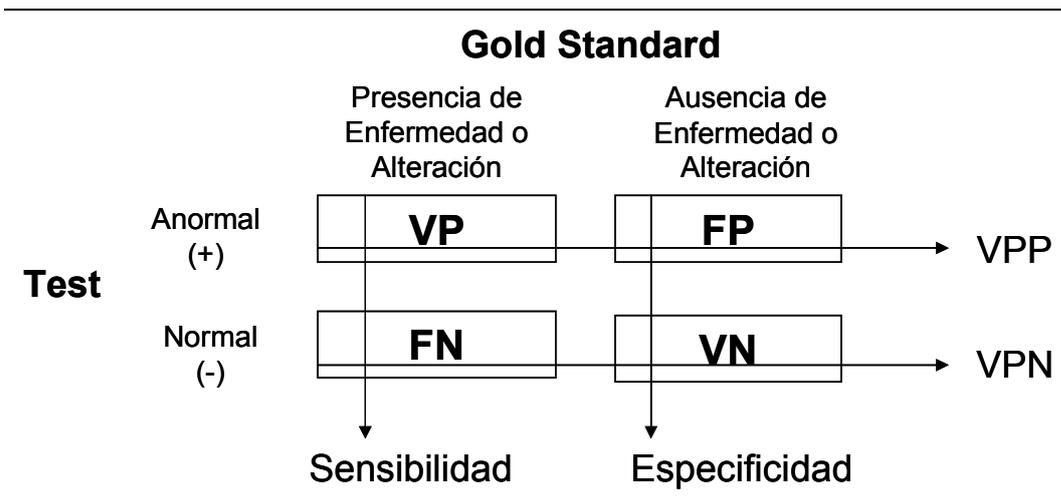
$$Tasa\ de\ falsos\ negativos = \frac{c}{(c + a)} = \frac{FN}{(FN + VP)}$$

Los cálculos de la sensibilidad y la especificidad se realizan en columnas separadas: el cálculo de sensibilidad se hace sobre el grupo de enfermos y el de especificidad sobre el grupo de no enfermos (Figura 16). Esto significa que, al menos en teoría, estos parámetros son independientes de la proporción de enfermos, y se les puede considerar como “propiedades intrínsecas del test”. Se pueden utilizar en todas las poblaciones y no varían con la prevalencia.

5.1.4 Valores predictivos positivos y negativos

A diferencia de la sensibilidad y la especificidad, los valores predictivos trabajan sobre filas, y dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada (Figura 17).

Figura 17. Estadísticos de eficiencia diagnóstica derivados de la tabla 2x2



VP, verdadero positivo; FP, falso positivo; FN, falso negativo; VN, verdadero negativo; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo.

Cuando la proporción de enfermos (probabilidad pre-test) de la tabla 2x2 ($[VP + FN] / [VP + FP + FN + VN]$) es real (y sólo en este caso), los valores predictivos del test pueden calcularse directamente a partir de la tabla:

$$\text{Valor Predictivo Positivo} = \frac{a}{(a + b)} = \frac{VP}{(VP + FP)}$$

$$\text{Valor Predictivo Negativo} = \frac{d}{(d + c)} = \frac{VN}{(VN + FN)}$$

Cuando la proporción de enfermos de la tabla no refleja la probabilidad pre-test real, los valores calculados a partir de la tabla 2x2 no representan los valores predictivos reales. Debido a la limitación de su dependencia de la prevalencia se han propuesto diferentes soluciones. En caso de conocer la prevalencia de la enfermedad en la población a estudiar, se pueden estimar los VP a esa prevalencia. Otra alternativa es calcular estadísticos no condicionados por la prevalencia como uVPP y uVPN. Estos estadísticos son estimaciones del VPP y VPN, mediante simulaciones con distintas prevalencias utilizando el método de Monte Carlo, obteniéndose un valor predictivo no condicionado por el valor inicial de la prevalencia.

5.1.5 Exactitud diagnóstica

Este parámetro representa la fracción total de aciertos del test, es decir, el total de resultados que son objetivamente correctos. Su uso está

limitado como medida de interpretación de un test porque se encuentra fuertemente influenciada por la prevalencia.

$$\text{Exactitud diagnóstica} = \frac{(\text{VP} + \text{VN})}{(\text{VP} + \text{FP} + \text{VN} + \text{FN})}$$

$$\text{Exactitud diagnóstica} = \text{Prob pre-test} \times \text{Sensibilidad} + (1 - \text{Prob pre-test}) \times \text{Especificidad}$$

5.2 Validez clínica

La sensibilidad y la especificidad nos permiten valorar una prueba diagnóstica, pero carecen de beneficio en la práctica clínica. Aportan información sobre la utilidad del test según el objetivo diagnóstico y el tipo de patología que queremos detectar, es decir, nos habla de validez diagnóstica. Pero estos estadísticos no nos indican si tras el test el paciente padece la enfermedad o no. Nos dan información sobre la probabilidad de que un sano tenga un test normal (especificidad) o de que un enfermo tenga un test anormal (sensibilidad). Los VP nos dan información sobre qué probabilidad existe de que un test normal se presente en un sano (VPN) y la probabilidad de que un test anormal se presente en un enfermo (VPP). Si bien los VP nos dan información desde la perspectiva del paciente, su utilidad queda limitada por su dependencia de la prevalencia. Por ello es necesario definir otro tipo de parámetro que nos indique la relación entre el resultado del test y el estado de salud del paciente (sano-enfermo).

5.2.1 Likelihood ratio positiva y negativa

Estos parámetros son de gran interés para valorar la información aportada por una prueba diagnóstica. Son los llamados cocientes de probabilidad o cocientes de verosimilitud, en inglés, likelihood ratio (LR).

La LR de un test se define como la probabilidad de ese resultado en enfermos dividido por la probabilidad de ese mismo resultado en no enfermos. El cociente de probabilidad indica en qué medida ese resultado es más probable en enfermos que en no enfermos. Representa la magnitud de cambio de una sospecha clínica inicial de presencia de la enfermedad (probabilidad pre-test) a la probabilidad de la enfermedad después del resultado del test (probabilidad post-test). La LR es de enorme utilidad.

La ventaja de estos índices frente a los VPP y VPN de la prueba radica en que, a diferencia de éstos, no dependen de la proporción de enfermos en la muestra, sino tan solo de la sensibilidad y especificidad de ésta, de ahí su utilidad a la hora de comparar pruebas diagnósticas. Es la forma más extendida de expresar y comparar la validez clínica de diferentes tests (Greenhalgh *et al.*, 1997; Sackett *et al.*, 1991). Se calculan con las fórmulas descritas posteriormente.

$$LR+ = \frac{\frac{a}{(a+c)}}{\frac{b}{(b+c)}}$$

$$LR+ = \frac{\text{Sensibilidad}}{(1 - \text{Especificidad})}$$

$$LR- = \frac{\frac{c}{(c+a)}}{\frac{d}{(d+b)}}$$

$$LR- = \frac{(1 - \text{Sensibilidad})}{\text{Especificidad}}$$

A mayores valores de LR+ mejor capacidad del test para diagnosticar presencia de la enfermedad. A menores valores de LR- mejor capacidad diagnóstica de la prueba para descartar la enfermedad. Por ello, si analizamos un test diagnóstico lo haremos evaluando el resultado de la LR+. En cambio los tests de screening se analizarán envaluando el resultado de la LR-.

5.2.2 Odds ratio diagnóstica

Existe otra forma de medir el rendimiento de un test: la “odds ratio” diagnóstica (DOR).

$$DOR = \frac{LR +}{LR -}$$

Algunos autores desaconsejan su uso para comparar tests, ya que, como se observa en la tabla 4, se pueden obtener valores iguales de DOR con diferentes LR positiva y negativa, lo que puede llevar a malas interpretaciones sobre la validez clínica de los tests.

Tabla 4. Estimación de la odds ratio diagnóstica con distintos valores de LR

Sensibilidad	Especificidad	LR+	LR-	DOR
99%	71%	3.44	0.01	231
97%	86%	6.95	0.03	231
94%	94%	15.19	0.07	231
86%	97%	33.21	0.14	231
71%	99%	67.09	0.29	231

LR+, likelihood ratio positiva; LR-, likelihood ratio negativa; DOR, odds ratio diagnóstica.

5.2.3 Odds pre-test, odds post-test y probabilidad post-test

La frecuencia de enfermedad se puede expresar, en lugar de como una probabilidad, como una odds que se define como el cociente de una probabilidad dividida por su complementario:

$$\text{Odds} = \frac{\text{Prob}}{(1 - \text{Prob})}$$

Así, la odds pre-test es:

$$\text{Odds pre - test} = \frac{\text{Prevalencia}}{(1 - \text{Prevalencia})}$$

Las odds tienen unas propiedades matemáticas que las hacen muy apropiadas en el ámbito del diagnóstico. En particular el teorema de Bayes se puede expresar en forma de odds:

$$\text{Odds post - test} = \text{Odds pre - test} \times \text{LR}$$

Esta expresión indica con claridad que la probabilidad (odds) de enfermedad tras la realización del test depende de la probabilidad (odds) pre-test y de la evidencia (la LR) aportada por el test. Esta expresión facilita el cálculo de la probabilidad post-test a partir de la probabilidad pre-test y la LR.

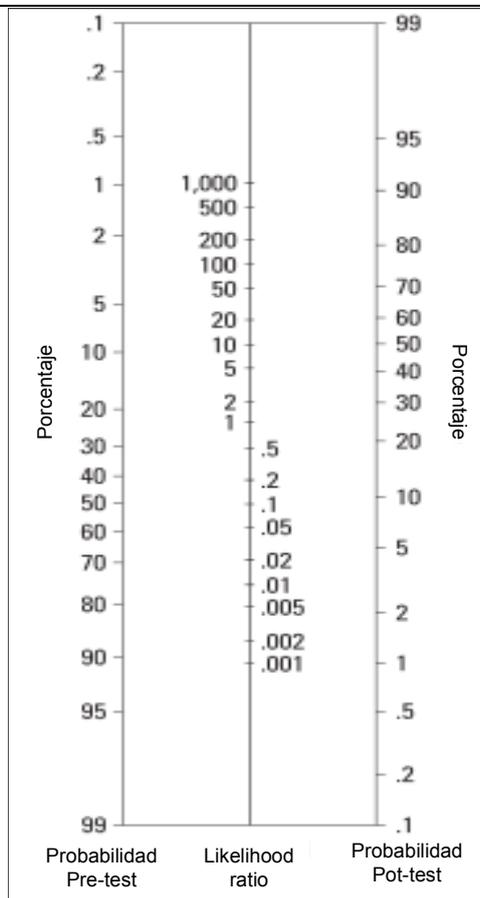
Así en primer lugar se calcula la odds pre-test, en segundo lugar la odds post-test, y en tercer lugar se pasa la odds a probabilidad post-test.

$$Probabilidad\ post - test = \frac{Odds\ post - test}{(1 + Odds\ post - test)}$$

5.2.4 Nomograma de Fagan

El nomograma de Fagan (Figura 18) permite calcular directamente la probabilidad post-test a partir de la probabilidad pre-test y la LR, sin necesidad de hacer las conversiones de odds a probabilidad y viceversa.

Figura 18. Nomograma de Fagan



La forma de utilizar este nomograma es la siguiente. En primer lugar se marca la probabilidad pre-test en la columna izquierda del nomograma. En segundo lugar se marca el valor de LR del test que se está evaluando en la columna del centro del nomograma. En tercer lugar se traza una línea recta que debe cruzar los dos puntos marcados previamente, prolongando ésta hasta la columna de la derecha del nomograma y obteniendo con este punto el valor de la probabilidad post-test.

6. Importancia de la probabilidad pre-test en la interpretación de un test

Si no tenemos ninguna información adicional sobre el sujeto, la probabilidad pre-test será la prevalencia de la patología en la población. Esta probabilidad pre-test sólo es aplicable en el caso de programas de “screening” sobre la población general, ya que en la práctica habitual los sujetos candidatos a una prueba diagnóstica lo son por las sospechas deducidas de la anamnesis o por una sintomatología, exploraciones o pruebas previas. Por tanto en la práctica habitual la probabilidad de que padezcan la enfermedad será superior a la prevalencia de ésta en la población general.

Van der Steeg *et al.* (2005) demostraron que la validez clínica de diferentes estudios de parejas estériles (histerosalpingografía o análisis de semen) está determinada por la prevalencia (probabilidad pre-test) del desorden de esterilidad en la población examinada.

Al disminuir la prevalencia disminuye la probabilidad de padecer la enfermedad tras un resultado positivo del test (VPP), con lo que aumenta el VPN. De este modo, la probabilidad de padecer la enfermedad tras la

prueba negativa es muy pequeña, por lo que la prueba negativa la descarta prácticamente. La rentabilidad de la prueba medida en máxima información aportada se obtiene con prevalencias del 40 al 60% (máximo en el 50%).

En prevalencias muy altas de la enfermedad, los resultados positivos son indicativos de la enfermedad y los negativos no la excluyen, pues la probabilidad de estar enfermo es alta cuando la prueba es negativa y positiva. En estos casos la prueba ayuda poco y habría que valorar si realizar la prueba o no.

6.1 Escenarios clínicos en el diagnóstico y tratamiento de la esterilidad por factor masculino

6.1.1 Relaciones naturales

En primer lugar cuando una pareja decide buscar un embarazo mediante relaciones naturales. El test diagnóstico puede llevarse a cabo en el laboratorio o en casa, utilizando tests o pruebas a la cabecera del paciente (Björndhal et al., 2006). El objetivo de este test es evitar retrasos en la investigación y tratamiento que originarían una reducción del éxito. Parejas con un resultado normal pueden ser alentadas a seguir intentándolo más tiempo mediante relaciones naturales. Varones con un resultado anormal probablemente no embarazarán de manera espontánea a su pareja y es mejor que sin más demora sean ayudados iniciando una investigación sobre la esterilidad con análisis de semen de acuerdo a los estándares internacionales (Lefièvre et al., 2007). La prevalencia de esterilidad por factor masculino en este escenario ha sido estimada en un 7.5% (el 15% de las parejas son estériles y en la mitad de ellas se cree que el factor masculino está involucrado) (SEF 2007).

6.1.2 Fértiles vs estériles

En segundo lugar, cuando una pareja ha estado buscando embarazo durante 12 meses mediante relaciones naturales sin éxito. En este escenario un test diagnóstico debe intentar esclarecer la causa de la esterilidad y pronosticar qué parejas quedarán gestantes espontáneamente en los próximos meses y cuales no. Estas últimas se beneficiarán de tratamientos con técnicas de reproducción asistida sin más demora.

Como la esterilidad por factor masculino en parejas estériles que acuden a un centro de referencia terciario o especializado es del 50%, los autores de estos estudios caso-control suelen establecer esta prevalencia (Sergerie et al., 2005).

6.1.3 Reproducción asistida

En tercer lugar, cuando son requeridas técnicas de reproducción asistida por esterilidad por factor masculino. En los programas de IUI, la probabilidad pre-test de no embarazo en la población estéril total está alrededor del 85% (Nyboe Andersen *et al.*, 2008; Ombelet *et al.*, 2002; Cabello et al., 2009) y en FIV/ICSI alrededor del 70% (Nyboe Andersen *et al.*, 2008).

6.2 Escenarios clínicos en la selección embrionaria

El PGS, por definición, se realiza en pacientes que no tienen anomalías cromosómicas conocidas, mutaciones u otras anormalidades genéticas. Se aplica por tanto en aquellas parejas en las que la prevalencia de aneuploidías cromosómicas se puede ver aumentada.

Las aneuploidías cromosómicas embrionarias son la causa más común en las pérdidas tempranas de embarazo. La prevalencia de estas aneuploidías embrionarias aumenta con la edad materna (AMA), y también puede estar incrementada en parejas cromosómicamente normales con abortos de repetición (RM), fallos repetidos de implantación tras transferencias de embriones de buena calidad morfológica (RIF) y factor masculino severo (SMF). Por ello el PGS ha sido recomendado para ser realizado tras FIV en estas parejas, con el fin de identificar y transferir sólo embriones euploides y de este modo mejorar las tasas de implantación y disminuir las pérdidas tempranas de embarazo (ASRM Practice Committee, 2007).

6.2.1 Edad materna avanzada

El riesgo de aborto y la prevalencia de aneuploidía embrionaria aumentan con la edad materna, tanto en embarazos obtenidos por concepción natural como en aquellos que resultan de FIV (Simpson, 1980; Warburton et al., 1980). En mujeres con edad reproductiva avanzada, la mayoría de los embriones analizados en día 3 con FISH son aneuploides (Platteau et al., 2005; Munne et al., 1995). El valor de la prevalencia de aneuploidías embrionarias obtenido en este grupo en el PGD Consortium de la Sociedad Europea de Reproducción Humana (Goossens et al., 2009) es 72%.

6.2.2 Abortos de repetición

La gran mayoría de los abortos espontáneos tras la concepción del embarazo se deben a aneuploidías embrionarias (Simpson 1980; Eiben et al., 1990). Las pérdidas repetidas de embarazo o abortos de repetición tradicionalmente ha sido definidas como 3 o más pérdidas de embarazo

antes de la semana 20 de gestación (ASRM Practice Committee, 2007). Cuando la evaluación de este aborto no revela ninguna causa específica o factor que predisponga para ello, la probabilidad de embarazo posterior con éxito es aproximadamente del 70%, dependiendo del número de abortos previos y sus cariotipos (Ogasawara et al., 2000; Balasch et al., 1996; Clifford et al., 1997). La prevalencia de aneuploidías embrionarias descrita en este grupo por el PGD Consortium de la Sociedad Europea de Reproducción Humana (Goossens et al., 2009) es 63%.

6.2.3 Fallos repetidos de implantación

El RIF ha sido definido como el fracaso de 3 o más ciclos de FIV/ICSI con transferencias de embriones de buena calidad morfológica (ASRM Practice Committee, 2007). Aproximadamente más de la mitad de los embriones de estas pacientes presentan anormalidades cromosómicas, siendo la prevalencia de aneuploidías cromosómicas en estas parejas del 63% en el PGD Consortium de la Sociedad Europea de Reproducción Humana (Goossens et al., 2009).

6.2.4 Factor masculino severo

La primera dificultad surge al intentar encontrar una definición unánime del factor masculino severo (FMS), no existiendo autores que lo definan de manera detallada. Los espermatozoides obtenidos en estos varones, procedentes del eyaculado o de testículo, muestran una alta prevalencia de anormalidades cromosómicas que puede predisponer a un aumento de aneuploidías embrionarias (Calogero et al., 2001). No obstante, la prevalencia de aneuploidías cromosómicas en el PGD Consortium de la Sociedad Europea de Reproducción Humana para este grupo es del 57,7% (Goossens et al., 2009).

Objetivos

Como se ha comentado en la introducción, la validez clínica de un test nuevo clínico debe ser evaluada antes de su incorporación a la práctica diaria, con el fin de determinar si la introducción del nuevo tests va a aportar más información o cambiar la actitud terapéutica. Esta validez clínica dependerá en gran medida del escenario clínico donde se utilice.

Recientemente, dentro del estudio y tratamiento de la pareja estéril, las pruebas complementarias al análisis de semen clásico, como la fragmentación del DNA espermático (Ej. SCSA), han despertado un gran interés. De igual modo, dentro del tratamiento de la pareja estéril mediante FIV/ICSI, los nuevos tests de selección embrionaria, como PGS-FISH, han revolucionado las indicaciones de estas técnicas. Por ello, en este trabajo nos propusimos:

1. Evaluar y comparar la validez diagnóstica y clínica de los parámetros clásicos de semen y el SCSA en diferentes escenarios clínicos: parejas que buscan embarazo mediante relaciones naturales, grupo de varones de parejas fértiles vs. varones de parejas estériles por factor masculino y en el grupo parejas que requiere inseminación intrauterina debido a esterilidad por factor masculino.
2. Evaluar y comparar la validez diagnóstica y clínica de la morfología embrionaria y del PGS-FISH para la selección embrionaria en parejas con: edad materna avanzada, fallo repetido de implantación, abortos de repetición y factor masculino severo.

Material y Métodos

1. Escenarios clínicos analizados

Las situaciones clínicas en las que se analiza la validez clínica del SCSA y el PGS-FISH en el diagnóstico y tratamiento de la pareja estéril en nuestro estudio son las siguientes.

1.1 Evaluación de la validez clínica del SCSA y los CSP en el diagnóstico del factor masculino

- a) Relaciones naturales: parejas que buscan embarazo mediante relaciones naturales. La prevalencia de esterilidad por factor masculino en este escenario ha sido estimada en un 7.5% (SEF, 2007).
- b) Fértiles vs estériles: bajo este epígrafe se incluyen varones de parejas fértiles vs. varones de parejas estériles por factor masculino. La probabilidad pre-test de esterilidad por factor masculino en este grupo se ha establecido en un 50% (Sergerie et al. 2005).
- c) IUI: pareja que requiere técnicas de reproducción asistida mediante inseminación intrauterina debido a esterilidad por factor masculino. La probabilidad pre-test de no embarazo en estas parejas se estima en un 85% (Ombelet et al., 2002; Nyobe Andersen et al., 2008).

1.2 Evaluación de la validez clínica del PGS-FISH y morfología embrionaria en la selección embrionaria

- a) AMA: parejas en laS que la mujer presenta una edad avanzada para quedar gestante. La edad materna más baja considerada en nuestro estudio edad materna avanzada ha sido 35 años.
- b) RM: pareja en la que la mujer presenta pérdidas repetidas de embarazo. El número de pérdidas de embarazo más bajo a partir del que se consideraron abortadas de repetición en nuestro estudio fue 2 abortos.
- c) RIF: pareja en la que la mujer presenta fallos de implantación embrionaria tras ciclos repetidos de FIV. El número de ciclos a partir del cual se consideró en nuestro estudio fallo repetido de implantación fue desde 2 ciclos.
- d) SMF: pareja en la que el varón presenta factor masculino severo. Como se ha comentado en la introducción, no existe una definición detallada y precisa sobre factor masculino severo, por lo que en nuestro trabajo hemos incluido estudios con diferentes patologías: desde oligozoospermia hasta teratozoospermia absoluta.

La prevalencia de aneuploidías embrionarias en todos los escenarios clínicos se definió según los resultados obtenidos en la búsqueda bibliográfica (ver apartado 1 Búsqueda sistemática).

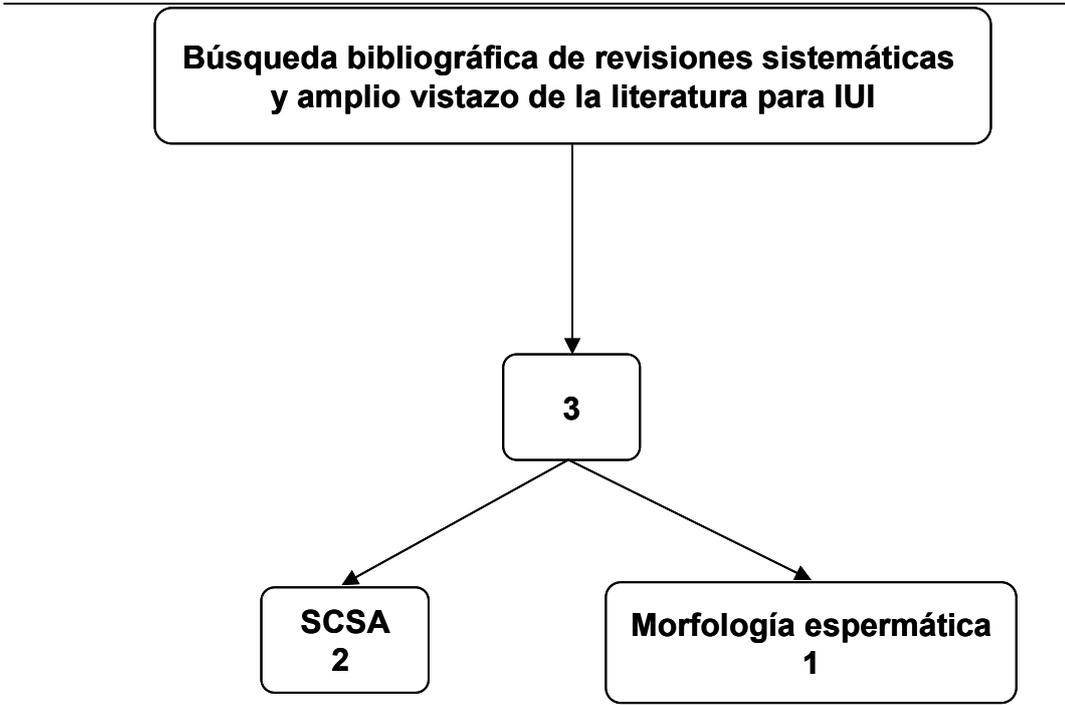
2. Búsqueda sistemática

2.1 Evaluación de la validez clínica del SCSA y CSP en el diagnóstico del factor masculino

Con el fin de comparar la validez clínica del SCSA vs los parámetros clásicos de semen en el diagnóstico de la esterilidad por factor masculino, estudiamos los resultados de revisiones sistemáticas publicados de cada test en cada situación clínica analizada. En caso de no hallar ninguna, efectuamos una búsqueda sistemática de artículos publicados al respecto.

Sólo para la situación clínica de parejas que requieren técnicas de reproducción asistida mediante IUI por una esterilidad por factor masculino se encontraron revisiones sistemáticas: 2 para fragmentación del DNA analizado mediante el SCSA (Evenson and Wixon, 2006; Cocuzza et al., 2007) y 1 para morfología espermática (Van Waart y *al.* 2001) (Figura 19).

Figura 19. Diagrama de la búsqueda de revisiones sistemáticas para el cálculo de tablas 2x2 en parejas que requieren técnicas de reproducción asistida mediante inseminación intrauterina por una esterilidad por factor masculino.



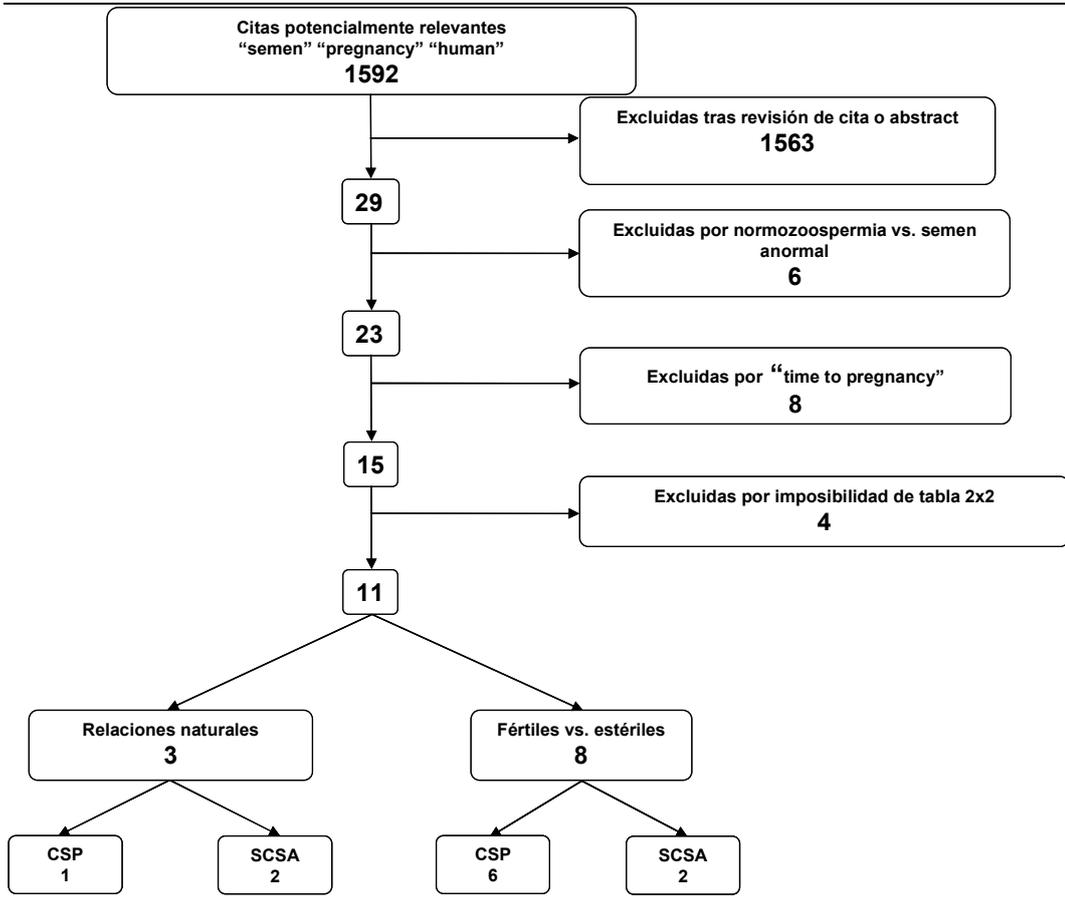
IUI, inseminación intrauterina.

Para las dos situaciones clínicas analizadas restantes, parejas que buscan embarazo mediante relaciones naturales y varones de parejas fértiles vs. varones de parejas estériles por factor masculino, no se encontró ninguna revisión sistemática que analizara la validez clínica del SCSA y los CSP. Por tanto se llevó a cabo la mencionada búsqueda sistemática en PubMed fechada desde la publicación de la tercera edición del manual de la OMS (agosto de 1993). No obstante, dado que la búsqueda sistemática de publicaciones relevantes produjo resultados limitados, consultamos otras fuentes de información y realizamos una

amplia revisión de la literatura para las situaciones clínicas mencionadas con el fin de no excluir ningún artículo relevante.

Para la búsqueda sistemática se combinaron los términos “semen”, “pregnancy” y “human” e inicialmente se obtuvieron 1592 resultados (Figura 20). Tras consultar los títulos y analizar sus “abstracts” fueron excluidas 1563. De esta manera, un total de 29 posibles publicaciones relevantes fueron analizadas, de las cuales 6 fueron excluidas por comparar pacientes normozoospermicos y oligoastenozoospermicos y 8 más por basar su estudio en “time to pregnancy”. De los 25 artículos potencialmente útiles sólo se incluyeron en el estudio aquellos que contenían (o el artículo permitía la reconstrucción) una tabla 2x2 (verdadero positivo, falso positivo, verdadero negativo, falso negativo), de tal manera que a partir de dicha tabla pudieran calcularse los estadísticos de eficiencia diagnóstica. De este modo, el número de publicaciones incluidas en el estudio se vio reducido a 11, de las cuales 3 eran del grupo de Relaciones Naturales (2 SCSA y 1 CSP), y 8 del grupo Fértiles vs. estériles (2 SCSA y 6 en CSP). Estos estudios se describen en la tabla 6.

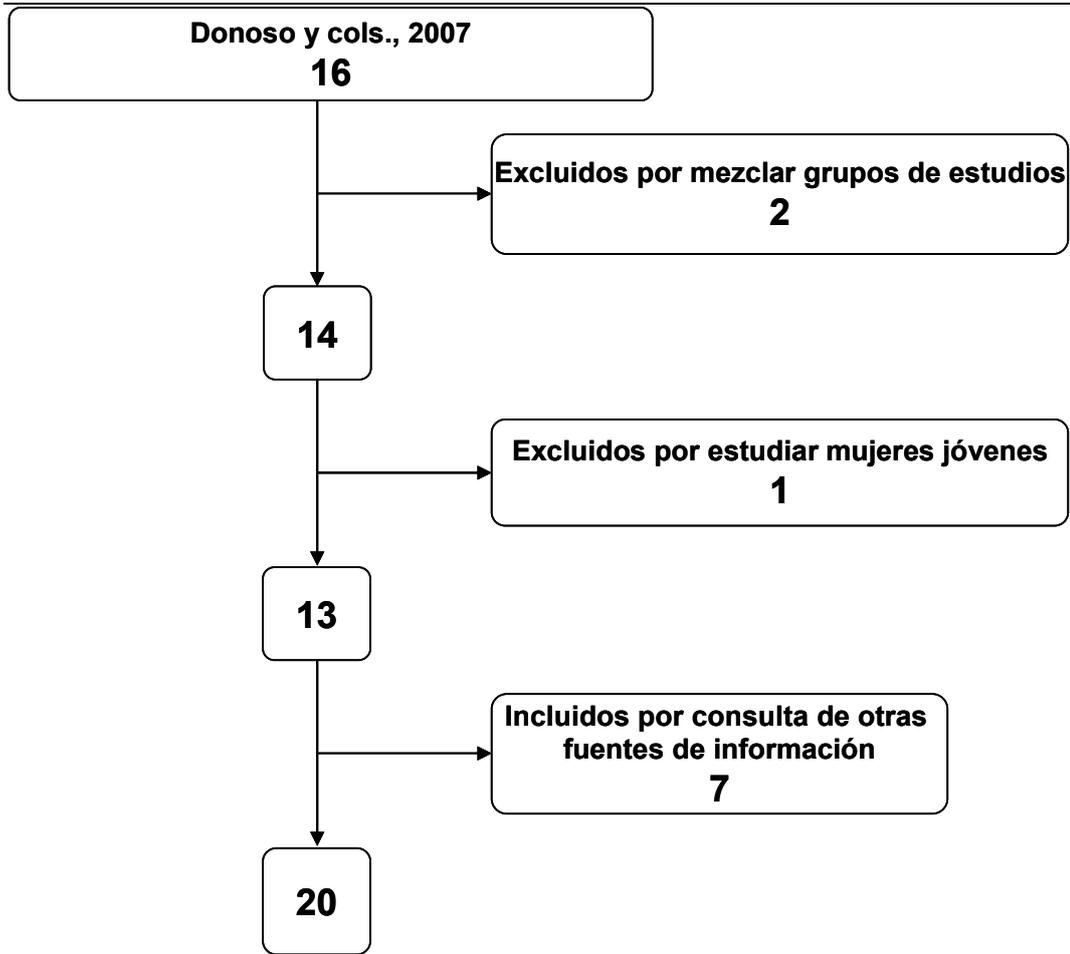
Figura 20. Diagrama de la búsqueda sistemática de bibliografía para el cálculo de tablas 2x2 en parejas que busca embarazo mediante relaciones naturales y en el grupo de varones de parejas fértiles vs. varones de parejas estériles por factor masculino.



2.2 Evaluación de la validez clínica del PGS-FISH vs. morfología embrionaria en la selección

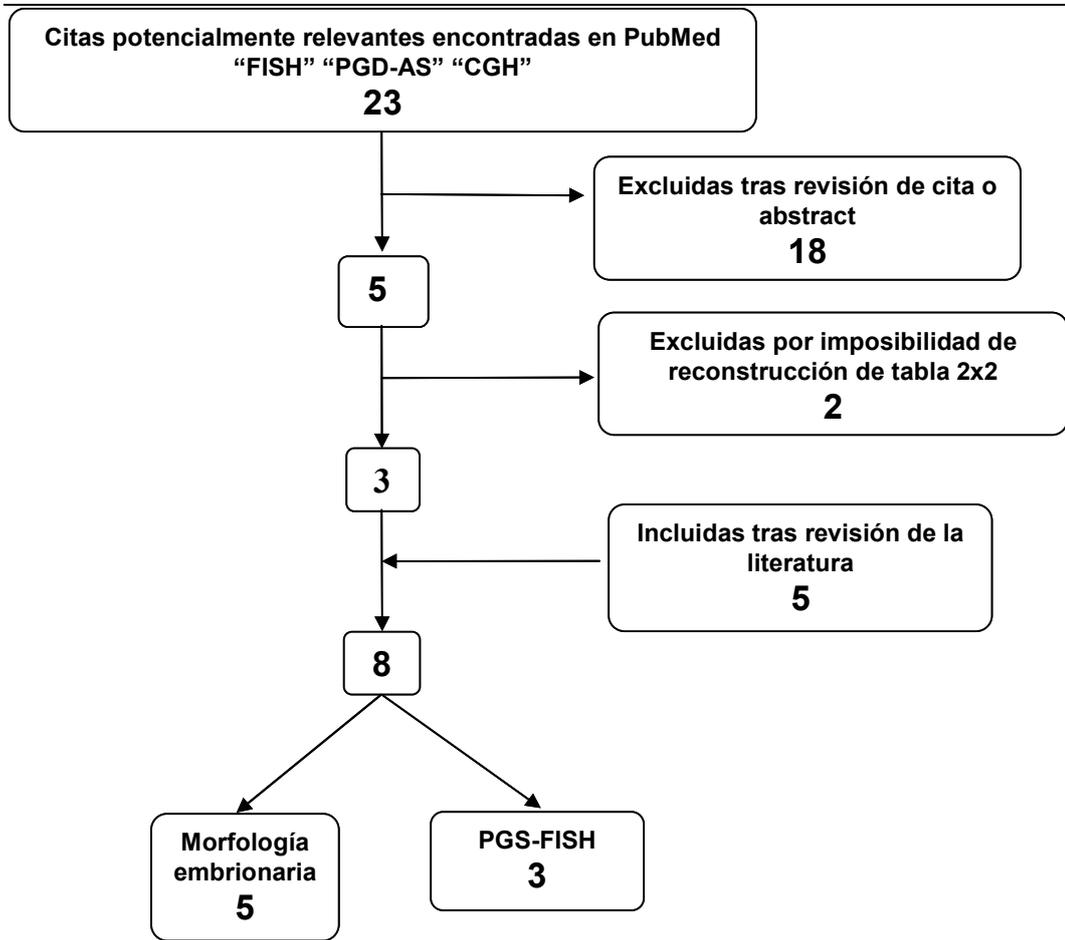
Para definir los valores de probabilidad pre-test de aneuploidías cromosómicas embrionarias (prevalencia) para los distintos grupos (AMA, RM, RIF y MF) nos basamos en una revisión de Donoso et al. (2007) y también llevamos a cabo una extensa revisión de la literatura. De la revisión de Donoso et al. (2007) se obtuvieron 16 artículos científicos para definir los valores de prevalencia, 13 de los artículos fueron incluidos en este estudio. Los 3 restantes fueron descartados por mezclar grupos de estudio en la población analizada y por incluir mujeres jóvenes en la población analizada. Tras consultar otras fuentes de información a través de citas bibliográficas se incluyeron 7 artículos más (Figura 21).

Figura 21. Diagrama de la búsqueda sistemática de bibliografía para el cálculo de probabilidad pre-test de aneuploidías cromosómicas embrionarias en edad materna avanzada, abortadoras de repetición, fallos repetidos de implantación y factor masculino severo.



Por otro lado, para comparar la validez clínica del PGS-FISH vs morfología embrionaria en la selección embrionaria, realizamos una búsqueda sistemática en PubMed para reconstruir las tablas 2x2. La búsqueda sistemática está fechada hasta Junio de 2009, para la cual combinamos los términos “FISH” y “PGS”, y “CGH” y “PGS”. De los 23 artículos potencialmente útiles encontrados con esta búsqueda y los 5 hallados con un amplio vistazo a la literatura, sólo incluimos en él aquellos que contenían (o permitían la reconstrucción) la tabla 2x2, de manera que los estadísticos de eficiencia diagnóstica pudieran ser calculados. En total se incluyeron 8 artículos: 5 para morfología embrionaria y 3 para PGS-FISH (Figura 22). Además en el caso de los estudios que evalúan la morfología embrionaria como criterio de selección embrionaria el gold standard debía ser FISH; y en el caso de los estudios que evalúan la FISH como criterio de selección embrionaria el gold standard debía ser CGH.

Figura 22. Diagrama de la búsqueda sistemática de bibliografía para el cálculo de tablas 2x2 en edad materna avanzada, abortados de repetición, fallos repetidos de implantación y factor masculino severo.



2. Análisis estadístico

Con el fin de comparar la validez clínica del SCSA vs los parámetros clásicos de semen, y el PGS-FISH vs la morfología embrionaria, los siguientes estadísticos de eficiencia diagnóstica fueron calculados: sensibilidad, especificidad, LR+, LR- y DOR. Además también se calcularon el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN). De acuerdo con Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) un resultado anormal en cualquier test analizado se denominó como positivo (Bossuyt y al. 2003). En la tabla 5 se presenta una breve descripción de la fórmula utilizada para el cálculo de cada estadístico de eficiencia diagnóstica.

Tabla 5. Fórmulas utilizadas en el cálculo de los estadísticos de eficiencia diagnóstica

Estadístico de eficiencia diagnóstica	Fórmula
Sensibilidad (S)	$(VP) / (VP + FN)$
Especificidad (E)	$(VN) / (VN + FP)$
Valor Predictivo Positivo (VPP)	$(VP) / (VP + FP)$
Valor Predictivo Negativo (VPN)	$(VN) / (VN + FN)$
Probabilidad pre-test (Prevalencia)	$(VP + FN) / (VP + FP + FN + VP)$
Likelihood ratio negativo (LR+)	$S / (1 - E)$
Likelihood ratio positivo (LR-)	$(1 - S) / E$
DOR	$LR+ / LR-$
Odds pre-test	$Prevalencia / (1 - Prevalencia)$
Odds post-test	$[Prevalencia / (1 - Prevalencia)] * LR$
Probabilidad post-test	$(Odds post-test) / (Odds post-test - 1)$

VP, verdadero positivo; FP, falso positivo; FN, falso negativo; VN, verdadero negativo.

Para evitar el efecto de la prevalencia en los valores predictivos obtenidos se calcularon los valores predictivos no condicionados (uVPP; uVPN) (Jianliang Li et al., 2007) y además todos los estudios se estandarizaron a unos valores fijos de prevalencia:

- Evaluación de la validez clínica del SCSA y CSP en el diagnóstico del factor masculino: 7.5% (en parejas que busca embarazo mediante relaciones naturales; VPP-7.5 y VPN-7.5), 50% (en el grupo de varones de parejas fértiles vs. varones de parejas estériles por factor masculino; VPP-50 y VPN-50) y 85% (en parejas que requiere técnicas de reproducción asistida mediante inseminación intrauterina por una esterilidad por factor masculino; VPP-85 y VPN-85).
- Evaluación de la validez clínica del PGS-FISH y Morfología embrionaria en la selección embrionaria: 65% (edad materna avanzada, fallo repetido de implantación, abortos de repetición y factor masculino severo; VPP-65 y VPN-65).

En todos los casos se calculó una estimación puntual de los estadísticos de eficiencia diagnóstica y el intervalo de confianza asintótico. En aquellos casos en los que se utilizaron el uVPP y el uVPN su intervalo de confianza correspondiente fue calculado (Jialiang et al., 2007). Cuando las tablas 2x2 contenían algún cero en sus casillas se aplicó una corrección estándar añadiendo 0,5 a las 4 casillas de dicha tabla. La probabilidad post-test se calculó utilizando el Nomograma de Fagan (Fagan, 1975).

En concordancia con otras revisiones diagnósticas se esperaba una heterogeneidad considerable de los resultados entre los estudios (Collins et al., 2008). Por ello la heterogeneidad se cuantificó utilizando el valor de la I^2 , es decir, la proporción de variabilidad a través de los estudios que es debida más a la heterogeneidad que a la casualidad (Higgins and Thompson, 2002). Valores muy altos a este respecto (por encima de 0,5) reflejan un alto grado de heterogeneidad y sugiere la necesidad de realizar un estudio más detallado de los subgrupos. En nuestro caso el bajo número de estudios no permitió llevar a cabo una exploración detallada de las razones de heterogeneidad utilizando técnicas de meta-regresión.

Finalmente llevamos a cabo una estimación “pooled” de los estadísticos de eficiencia diagnóstica para cada test, y se comparó el SCSA vs. CSP y el PGS-FISH vs. morfología embrionaria utilizando el método propuesto por Dersimonian y Laird (1987), ya que se afecta poco por la heterogeneidad entre los estudios. Se calculó el valor pooled para cada estadístico de eficiencia diagnóstica. Este valor pooled se calcula realizando una estimación conjunta de un estadístico determinado teniendo en cuenta el peso de cada uno de los artículos incluidos en el estudio. Para calcular la “pooled” odds ratio diagnóstica y la LR se añadió un factor de corrección de 0,5 a todas las casillas de la tabla 2x2, y se calcularon sus logaritmos, interpretándose según las recomendaciones de Gart and Zweifil (1967). Los datos de los diferentes estudios fueron analizados utilizando el software STATA (10.1) (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

Además para la evaluación de la validez clínica del PGS-FISH y morfología embrionaria en la selección embrionaria se aplicó una distribución hipergeométrica. Mediante esta distribución se evaluó la

probabilidad de seleccionar al menos un embrión euploide en una cohorte de 6 embriones morfológicamente normales seleccionados por morfología embrionaria o por PGS-FISH cuando se transfieren uno, dos o tres embriones. Asimismo mediante este modelo determinamos cuál debería ser el rendimiento diagnóstico (LR-) de cualquier test de selección embrionaria para tener más validez clínica que la morfología embrionaria.

Resultados

1. Evaluación de la validez clínica del SCSA y CSP en el diagnóstico del factor masculino.

1.1 Resultado de la búsqueda sistemática de bibliografía

El resultado de la búsqueda sistemática de bibliografía para el cálculo de las tablas 2x2 se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Estudios incluidos para el cálculo de los estadísticos de eficiencia diagnóstica para SCSA y parámetros clásicos de semen en el diagnóstico del factor masculino

Estudios	Escenario clínico	Espectro de pacientes	Test	Parámetros seminales	VP	FN	FP	VN
Evenson et al., 1999	Relaciones naturales	Parejas que buscan embarazo	SCSA	DFI	6	25	4	109
Spano et al., 2000	Relaciones naturales	Parejas que buscan embarazo	SCSA	DFI	25	84	4	102
Bonde et al., 1998	Relaciones naturales	Parejas que buscan embarazo	CSP	Concentración espermática	49	120	28	221
Chohan et al., 2006	Fértiles vs. estériles	Donantes fértiles, hombres de parejas estériles	SCSA	DFI	12	48	0	7
Saleh et al., 2002	Fértiles vs. estériles	Donantes fértiles, hombres de parejas estériles	SCSA	DFI	53	39	0	15
			CSP	Concentración, motilidad, morfología	21	71	1	15
Bartoov et al., 1993	Fértiles vs. estériles	Hombres de parejas fértiles, hombres de parejas estériles	CSP	"Semen Analysis Index"	43	64	3	98
Guzick et al., 2001	Fértiles vs. estériles	Hombres de parejas fértiles, hombres de parejas estériles	CSP	Concentración espermática	113	652	27	669
Menkveld et al., 2001	Fértiles vs. estériles	Hombres de parejas fértiles, hombres de parejas estériles por oligozoospermia	CSP	Morfología	77	26	24	83
Nallella et al., 2006	Fértiles vs. estériles	Hombres de parejas fértiles, hombres de parejas estériles	CSP	Porcentaje de Motilidad	123	43	6	50
Ombelt et al., 1997a	Fértiles vs. estériles	Hombres de parejas fértiles, parejas de parejas estériles	CSP	Nº espermatozoides	85	51	27	117
Bungum et al., 2004	Inseminación intrauterina	Esterilidad desconocida	SCSA	DFI	22	86	1	22
Bungum et al., 2007	Inseminación intrauterina	Esterilidad desconocida	SCSA	DFI	64	245	2	76
Karabinus and Gelyy, 1997	Inseminación intrauterina	Esterilidad desconocida	CSP	Morfología	50	441	3	44
Lindheim et al., 1996	Inseminación intrauterina	Población general estéril	CSP	Morfología	98	62	1	15
Matorras et al., 1995	Inseminación intrauterina	Población general estéril	CSP	Morfología	154	89	18	10
Montanaro-Gauci et al., 2001	Inseminación intrauterina	Población general estéril	CSP	Morfología	37	239	1	35
Ombelt y al, 1997b	Inseminación intrauterina	Población general estéril	CSP	Morfología	295	384	40	76
Toner et al., 1995	Inseminación intrauterina	Población general estéril	CSP	Morfología	80	274	6	35

VP, verdadero positivo; FP, falso positivo; FN, falso negativo; VN, verdadero negativo; SCSA, test de la estructura de la cromatina espermática; CSP, parámetros clásicos de semen; DFI, índice de fragmentación del DNA espermático.

1.2 Análisis estadístico de las diferentes situaciones clínicas estudiadas

En todos los escenarios analizados, los estadísticos “pooled” de especificidad, VPP, VPP a valores fijos y uVPP fueron mayores que los estadísticos pooled de sensibilidad, VPN, VPN a valores fijos y uVPN, respectivamente.

1.2.1 Relaciones Naturales

Al analizar la validez clínica del SCSA y los CSP en parejas que buscan embarazo mediante relaciones naturales, solo la especificidad “pooled” mostró un valor significativamente más alto en SCSA que en CSP, mientras que los otros estadísticos de eficiencia diagnóstica obtenidos muestran valores similares en SCSA y parámetros clásicos de semen (Tabla 7 y 8). En este escenario, después de un resultado anormal con SCSA, la probabilidad de esterilidad por factor masculino incrementó de un 7.5% pre-test a un 32.1% post-test (IC 15.7-54.5). Y después de un análisis con parámetros clásicos de semen con un resultado anormal, se incrementa a una probabilidad post-test de 17.3% (IC 11.8-24.5) (Figura 23). Estas diferencias en el valor de las LR no son estadísticamente significativas (Tabla 7).

Tabla 7. Estadísticos de eficiencia diagnóstica no relacionados con la prevalencia para SCSA y parámetros clásicos de semen en parejas que buscan embarazo mediante relaciones naturales

	S	E	LR+	LR-	DOR	
SCSA	Evenson et al., 1999	0.19 (0.70, 0.36)	0.96 (0.92, 0.99)	5.47 (1.36, 26.60)	0.84 (0.66, 0.97)	6.20 (1.53, 24.76)
	Spano et al., 2000	0.23 (0.15, 0.32)	0.96 (0.92, 0.99)	6.08 (2.57, 28.11)	0.80 (0.71, 0.89)	6.87 (2.78, 25.69)
	<i>pooled</i>	0.22 (0.15, 0.30)	0.96 (0.94, 0.99)	5.83 (2.30, 14.81)	0.81 (0.73, 0.89)	6.60 (2.77, 15.73)
	I^2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CSP	Bonde et al., 1998	0.29 (0.22, 0.36)	0.89 (0.85, 0.93)	2.58 (1.78, 4.28)	0.80 (0.72, 0.88)	3.19 (1.98, 5.56)
	<i>pooled</i>	0.29 (0.22, 0.36)	0.89 (0.85, 0.93)	2.58 (1.66, 4.00)	0.80 (0.71, 0.89)	3.19 (1.91, 5.36)
	I^2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	p^*	NS	$p < 0.001$	NS	NS	NS

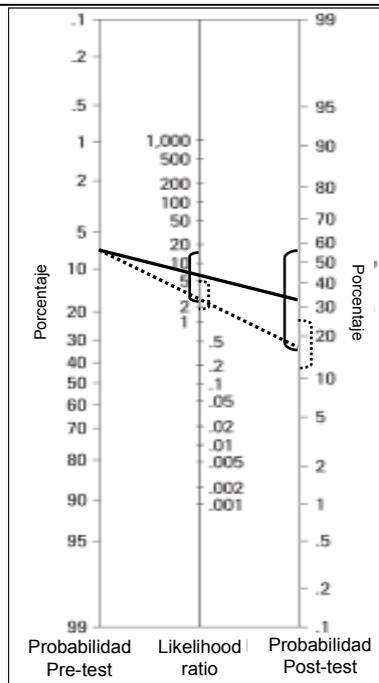
S, sensibilidad; E, especificidad; LR+, likelihood ratio positiva; LR-, likelihood ratio negativa; DOR, odds ratio diagnóstica; SCSA, test de la estructura de la cromatina espermática; CSP, parámetros clásicos de semen; Números entre paréntesis: intervalos de confianza.

Tabla 8. Estadísticos de eficiencia diagnóstica relacionados con la prevalencia para SCSA y parámetros clásicos de semen en parejas que buscan embarazo mediante relaciones naturales

	VPP	VPN	uVPP	uVPN	VPP-7.5	VPN-7.5
Evenson et al., 1999	0.60 (0.25, 0.89)	0.81 (0.74, 0.88)	0.76 (0.55, 0.91)	0.53 (0.50, 0.57)	0.31 (0.10, 0.68)	0.94 (0.93, 0.95)
Spano et al., 2000	0.86 (0.71, 0.97)	0.55 (0.47, 0.62)	0.77 (0.65, 0.91)	0.54 (0.52, 0.56)	0.33 (0.17, 0.70)	0.94 (0.93, 0.95)
<i>pooled</i>	0.77 (0.73, 1.02)	0.68 (0.42, 0.94)	0.77 (0.66, 0.87)	0.53 (0.52, 0.55)	0.32 (0.13, 0.52)	0.94 (0.93, 0.94)
f^2	55.2	96.4	0.0	0.0	0.0	0.0
Bonde et al., 1998	0.64 (0.53, 0.75)	0.65 (0.6, 0.70)	0.65 (0.60, 0.73)	0.54 (0.52, 0.55)	0.17 (0.13, 0.26)	0.94 (0.93, 0.95)
<i>pooled</i>	0.64 (0.53, 0.75)	0.65 (0.60, 0.70)	0.65 (0.59, 0.72)	0.54 (0.52, 0.55)	0.17 (0.11, 0.24)	0.94 (0.93, 0.95)
f^2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
p^*	NS	NS	NS	NS	NS	NS

VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; uVPP, valor predictivo positivo no condicionado; uVPN, valor predictivo negativo no condicionado; VPP-7.5, valor predictivo positivo a prevalencia fija del 7.5%; VPN-7.5, valor predictivo negativo a prevalencia fija del 7.5%; SCSA, test de la estructura de la cromatina espermática; CSP, parámetros clásicos de semen; Números entre paréntesis: intervalos de confianza.

Figura 23. Nomograma de Fagan utilizando el valor de likelihood ratio y la probabilidad pre-test para SCSA y parámetros clásicos de semen en parejas que buscan embarazo mediante relaciones naturales.



SCSA: líneas continuas; CSP: líneas discontinuas. Intervalos de confianza: llaves.

1.2.2 Fértiles vs. Estériles

Se observó una elevada heterogeneidad ($I^2 > 0.50$) entre los estudios incluidos en la comparación de la validez clínica de del SCSA vs los CSP en el grupo de varones de parejas fértiles vs. varones de parejas estériles por factor masculino (Tabla 9 y 10). Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el VPP y VPN, con un mayor VPP para SCSA y un mayor VPN para los parámetros clásicos de semen. De cualquier manera, estas diferencias desaparecen con el VPP-50, VPN-50, uVPP y uVPN (Tabla 10). Para prevalencias de esterilidad por factor masculino del 50%, la probabilidad post-test de esterilidad por factor masculino después de un resultado anormal del test es muy similar para SCSA y CSP (Figura 24).

Tabla 9. Estadísticos de eficiencia diagnóstica no relacionados con la prevalencia para SCSPA y parámetros clásicos de semen en el grupo de varones de parejas fértiles vs. varones de parejas estériles por factor masculino

	S	E	LR+	LR-	DOR
Chohan et al., 2006	0.20 (0.10, 0.31)	0.87 (0.60, 0.96)	1.60 (0.43, 5.69)	0.91 (0.75, 1.35)	1.29 (0.25, 6.84)
Saleh et al., 2002	0.58 (0.48, 0.67)	0.94 (0.78, 0.98)	9.22 (2.43, 24.07)	0.45 (0.34, 0.59)	14.00 (3.60, 58.97)
<i>pooled</i>	0.39 (0.02, 0.76)	0.92 (0.84, 1.01)	3.94 (0.71, 21.91)	0.64 (0.32, 1.28)	4.43 (0.43, 45.79)
I^2	96.3	0.0	74.4	91.6	78.6
SCSPA					
Bartoov et al., 1993	0.40 (0.31, 0.49)	0.97 (0.93, 0.99)	13.53 (5.53, 70.00)	0.62 (0.52, 0.71)	18.98 (7.37, 89.57)
Guzick et al., 2001	0.15 (0.12, 0.17)	0.96 (0.95, 0.97)	3.81 (2.56, 5.92)	0.89 (0.86, 0.92)	4.23 (2.79, 6.71)
Menkveld et al., 2001	0.75 (0.66, 0.83)	0.78 (0.7, 0.85)	3.33 (2.42, 5.16)	0.32 (0.23, 0.45)	9.97 (5.49, 19.51)
Nallella et al., 2006	0.74 (0.67, 0.8)	0.89 (0.8, 0.96)	6.92 (3.59, 18.66)	0.29 (0.22, 0.37)	22.06 (9.82, 56.20)
Ombelet et al., 1997	0.62 (0.55, 0.7)	0.81 (0.75, 0.87)	3.33 (2.41, 5.13)	0.46 (0.36, 0.57)	7.09 (4.27, 13.02)
Saleh et al., 2002	0.23 (0.15, 0.33)	0.94 (0.78, 0.98)	3.65 (0.89, 10.35)	0.82 (0.71, 0.97)	3.11 (0.71, 13.19)
<i>pooled</i>	0.48 (0.22, 0.74)	0.90 (0.84, 0.95)	3.92 (3.00, 5.13)	0.53 (0.38, 0.74)	8.37 (4.80, 14.59)
I^2	99.0	88.5	26.4	96.2	69.8
p*	NS	NS	NS	NS	NS

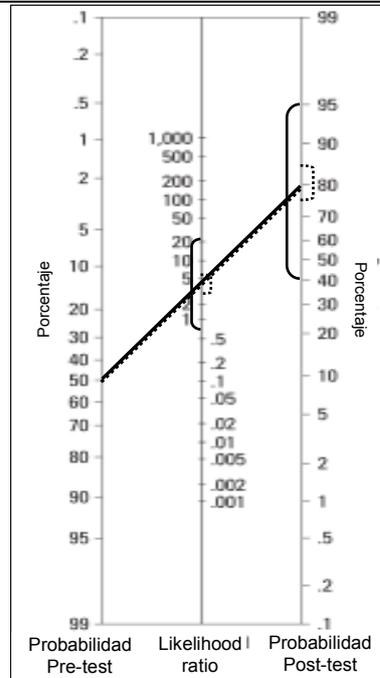
S, sensibilidad; E, especificidad; LR+, likelihood ratio positiva; LR-, likelihood ratio negativa; DOR, odds ratio diagnóstica; SCSPA, test de la estructura de la cromatina espermática; CSP, parámetros clásicos de semen; Números entre paréntesis: intervalos de confianza.

Tabla 10. Estadísticos de eficiencia diagnóstica relacionados con la prevalencia para SCSA y parámetros clásicos de semen en el grupo de varones de parejas fértiles vs. varones de parejas estériles por factor masculino

	VPP	VPN	uVPP	uVPN	VPP-50	VPN-50
Chohan et al., 2006	0.92 (0.73, 1.00)	0.13 (0.05, 0.23)	0.58 (0.36, 0.76)	0.51 (0.45, 0.55)	0.62 (0.30, 0.85)	0.52 (0.43, 0.57)
Saleh et al., 2002	0.98 (0.93, 1.00)	0.28 (0.16, 0.41)	0.82 (0.64, 0.90)	0.63 (0.59, 0.67)	0.90 (0.71, 0.96)	0.69 (0.63, 0.75)
<i>pooled</i>	0.98 (0.95, 1.01)	0.20 (0.05, 0.34)	0.71 (0.48, 0.95)	0.57 (0.46, 0.69)	0.79 (0.51, 1.06)	0.61 (0.44, 0.77)
f^2	0.0	73.2	74.7	91.9	71.7	91.8
SCSA						
Bartoov et al., 1993	0.93 (0.85, 1.00)	0.60 (0.53, 0.68)	0.85 (0.76, 0.95)	0.58 (0.57, 0.61)	0.93 (0.85, 0.97)	0.62 (0.58, 0.66)
Guzick et al., 2001	0.81 (0.74, 0.87)	0.51 (0.48, 0.53)	0.71 (0.65, 0.77)	0.52 (0.51, 0.52)	0.79 (0.72, 0.86)	0.53 (0.52, 0.54)
Menkveld et al., 2001	0.76 (0.68, 0.85)	0.76 (0.68, 0.84)	0.69 (0.64, 0.75)	0.68 (0.63, 0.74)	0.77 (0.71, 0.84)	0.75 (0.69, 0.82)
Nallella et al., 2006	0.95 (0.91, 0.98)	0.54 (0.44, 0.64)	0.79 (0.70, 0.88)	0.70 (0.66, 0.74)	0.87 (0.78, 0.95)	0.78 (0.73, 0.82)
Ombelet et al., 1997	0.76 (0.68, 0.83)	0.70 (0.63, 0.76)	0.69 (0.64, 0.75)	0.63 (0.59, 0.67)	0.77 (0.71, 0.84)	0.68 (0.64, 0.74)
Saleh et al., 2002	0.95 (0.84, 1.00)	0.17 (0.10, 0.26)	0.70 (0.48, 0.83)	0.53 (0.50, 0.56)	0.79 (0.47, 0.91)	0.55 (0.51, 0.59)
<i>pooled</i>	0.86 (0.79, 0.94)	0.55 (0.41, 0.68)	0.73 (0.68, 0.78)	0.60 (0.55, 0.66)	0.82 (0.76, 0.88)	0.65 (0.57, 0.73)
f^2	88.0	96.3	58.6	96.7	70.3	97.3
CSP						
p^*	$p < 0.05$	$p < 0.001$	NS	NS	NS	NS

VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; uVPP, valor predictivo positivo no condicionado; uVPN, valor predictivo negativo no condicionado; VPP-50, valor predictivo positivo a prevalencia fija del 50%; VPN-50, valor predictivo negativo a prevalencia fija del 50%; SCSA, test de la estructura de la cromatina espermática; CSP, parámetros clásicos de semen; Números entre paréntesis: intervalos de confianza.

Figura 24. Nomograma de Fagan utilizando el valor de likelihood ratio y la probabilidad pre-test para SCSA y parámetros clásicos de semen en el grupo de varones de parejas fértiles vs. varones de parejas estériles por factor masculino.



SCSA: líneas continuas; CSP: líneas discontinuas. Intervalos de confianza: llaves.

1.2.3 Reproducción Asistida

Se observó un alto grado de heterogeneidad en los estudios incluidos en el meta-análisis de morfología espermática en parejas sometidas a IUI por esterilidad por factor masculino (Tablas 11 y 12). En este escenario la validez clínica del SCSA fue mayor que la de la morfología espermática, con un valor de LR+ para SCSA de 6.1 (2.6-14.6) y de 1.85 (1.1-3.0) para morfología espermática ($p < 0.05$). Para una probabilidad pre-test del 85% de no embarazo con IUI, la probabilidad post-test de no embarazo después de un resultado anormal del SCSA era 97.2%, y después de un resultado anormal de morfología fue de 91.3% (Figura 25).

Tabla 11. Estadísticos de eficiencia diagnóstica no relacionados con la prevalencia para SCSA y parámetros clásicos de semen en parejas que requieren técnicas de reproducción asistida mediante inseminación intrauterina por esterilidad por factor masculino

	S	E	LR+	LR-	DOR
Bungum et al., 2004	0.20 (0.13, 2.29)	0.96 (0.85, 0.98)	4.68 (1.12, 12.75)	0.83 (0.73, 0.95)	3.90 (0.99, 16.49)
Bungum et al., 2007	0.21 (0.16, 0.26)	0.97 (0.93, 0.99)	8.08 (2.86, 33.83)	0.81 (0.76, 0.87)	8.04 (3.03, 42.51)
SCSA	<i>pooled</i> 0.21 (0.17, 0.25)	0.97 (0.94, 1.00)	6.13 (2.57, 14.59)	0.82 (0.77, 0.87)	5.73 (2.19, 15.01)
	<i>I²</i> 0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Karabinus and Gelety, 1997	0.10 (0.08, 0.13)	0.94 (0.85, 0.99)	1.60 (0.66, 8.57)	0.96 (0.90, 1.05)	1.45 (0.59, 9.46)
Lindheim et al., 1996	0.61 (0.54, 0.68)	0.94 (0.78, 0.98)	9.80 (2.74, 26.04)	0.41 (0.33, 0.51)	16.29 (4.50, 67.12)
Matorras et al., 1995	0.84 (0.77, 0.91)	0.19 (0.05, 0.43)	1.04 (0.86, 1.47)	0.84 (0.33, 3.64)	1.36 (0.25, 4.20)
Montanaro-Gauci et al., 2001	0.13 (0.10, 0.18)	0.97 (0.90, 100)	4.83 (1.25, 12.36)	0.89 (0.84, 0.96)	3.71 (1.12, 14.26)
Ombelet et al., 1995	0.43 (0.40, 0.47)	0.66 (0.57, 0.74)	1.26 (0.99, 1.73)	0.86 (0.74, 1.01)	1.45 (0.98, 2.29)
Toner et al., 1995	0.23 (0.18, 0.28)	0.85 (0.73, 0.95)	1.54 (0.80, 4.44)	0.91 (0.80, 1.07)	1.60 (0.73, 4.44)
CSP	<i>pooled</i> 0.39 (0.19, 0.59)	0.78 (0.63, 0.93)	1.85 (1.14, 3.02)	0.79 (0.67, 0.94)	2.32 (1.19, 4.53)
	<i>I²</i> 99.2	94.7	75.5	90.0	60.8
p*	NS	p<0.05	p<0.05	NS	NS

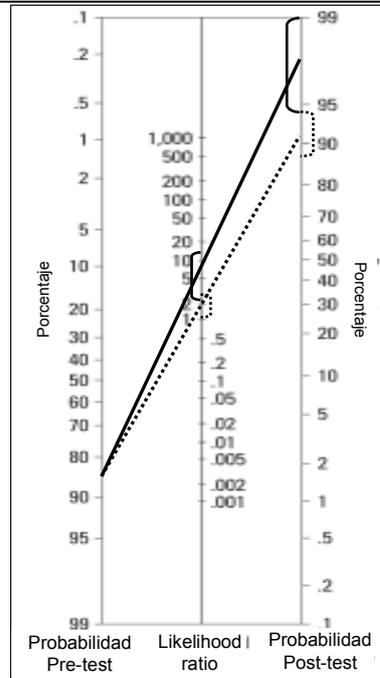
S, sensibilidad; E, especificidad; LR+, likelihood ratio positiva; LR-, likelihood ratio negativa; DOR, odds ratio diagnóstica; SCSA, test de la estructura de la cromatina espermática; CSP, parámetros clásicos de semen; Números entre paréntesis: intervalos de confianza.

Tabla 12. Estadísticos de eficiencia diagnóstica relacionados con la prevalencia para SCSA y parámetros clásicos de semen en parejas que requieren técnicas de reproducción asistida mediante inseminación intrauterina por esterilidad por factor masculino

	VPP	VPN	uVPP	uVPN	VPP-85	VPN-85
Bungum et al., 2004	0.96 (0.85, 1.00)	0.20 (0.13, 0.28)	0.74 (0.52, 0.85)	0.53 (0.51, 0.55)	0.96 (0.86, 0.97)	0.17 (0.16, 0.19)
Bungum et al., 2007	0.97 (0.99, 1.00)	0.24 (0.19, 0.299)	0.80 (0.67, 0.92)	0.53 (0.52, 0.55)	0.98 (0.94, 0.99)	0.18 (0.17, 0.19)
<i>pooled</i>	0.97 (0.93, 1.00)	0.23 (0.19, 0.27)	0.78 (0.68, 0.88)	0.53 (0.52, 0.54)	0.98 (0.95, 1.00)	0.18 (0.17, 0.19)
I^2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Karabinus and Gelety, 1997	0.94 (0.87, 1.00)	0.09 (0.06, 0.12)	0.58 (0.43, 0.81)	0.51 (0.49, 0.52)	0.90 (0.79, 0.98)	0.16 (0.14, 0.16)
Lindheim et al., 1996	1.00 (0.96, 1.00)	0.20 (0.11, 0.30)	0.83 (0.66, 0.91)	0.64 (0.61, 0.68)	0.98 (0.94, 0.99)	0.30 (0.26, 0.35)
Matorras et al., 1995	0.89 (0.83, 0.94)	0.13 (0.00, 0.31)	0.51 (0.48, 0.56)	0.53 (0.30, 0.68)	0.86 (0.83, 0.89)	0.17 (0.05, 0.35)
Montanaro-Gauci et al., 2001	0.97 (0.90, 1.00)	0.13 (0.09, 0.17)	0.74 (0.54, 0.85)	0.52 (0.51, 0.53)	0.97 (0.88, 0.99)	0.17 (0.16, 0.17)
Ormelet et al., 1995	0.88 (0.85, 0.92)	0.17 (0.13, 0.20)	0.54 (0.50, 0.60)	0.53 (0.50, 0.55)	0.88 (0.85, 0.91)	0.17 (0.15, 0.19)
Toner et al., 1995	0.93 (0.87, 0.98)	0.11 (0.08, 0.15)	0.57 (0.46, 0.73)	0.52 (0.49, 0.54)	0.90 (0.82, 0.96)	0.16 (0.14, 0.18)
<i>pooled</i>	0.94 (0.89, 0.98)	0.13 (0.10, 0.16)	0.62 (0.53, 0.70)	0.54 (0.51, 0.57)	0.91 (0.86, 0.97)	0.18 (0.16, 0.20)
I^2	86.1	66.1	83.3	90.9	89.7	86.1
p^*	NS	$p < 0.001$	$p < 0.05$	NS	$p < 0.05$	NS

VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; uVPP, valor predictivo positivo no condicionado; uVPN, valor predictivo negativo no condicionado; VPP-85, valor predictivo positivo a prevalencia fija del 85%; VPN-85, valor predictivo negativo a prevalencia fija del 85%; SCSA, test de la estructura de la cromatina espermática; CSP, parámetros clásicos de semen; Números entre paréntesis: intervalos de confianza.

Figura 25. Nomograma de Fagan utilizando el valor de likelihood ratio y la probabilidad pre-test para SCSA y parámetros clásicos de semen en parejas que requieren técnicas de reproducción asistida mediante inseminación intrauterina por esterilidad por factor masculino.



SCSA: líneas continuas; CSP: líneas discontinuas. Intervalos de confianza: llaves.

2. Evaluación de la validez clínica del PGS-FISH vs. Morfología embrionaria en la selección

2.1 Resultado de la búsqueda sistemática de bibliografía

La prevalencia de alteraciones cromosómicas embrionarias en los distintas indicaciones varió entre: 39.0-70.3% en AMA, 43.8-58.5% en RM en mujeres jóvenes (< 37), 63.2-75.0% en RM con AMA (\geq 37), 49.0-70.7% en RIF (independientemente de la edad materna) y 52.5-93.3% en SMF en función de la patología (Tabla 13). La mediana de alteraciones cromosómicas embrionarias en todos los trabajos analizados fue 65%, por lo que éste fue el valor de prevalencia (probabilidad pre-test) de aneuploidía embrionaria empleada en los cálculos posteriores.

En la tabla 14 se muestran las características de los estudios incluidos en la revisión para el cálculo de los estadísticos de eficiencia diagnóstica.

Tabla 13. Prevalencia de aneuploidías embrionarias en donantes de ovocitos, AMA, RM, RIF y SMF				
Grupo de estudio	Autor	Edad Materna	Otras características	PAE
Donantes de ovocitos	Kearns et al., 2005	21-31	-	52.0
	Soares et al., 2003	23-31	-	56.5
	Nelson et al., 2005	<30	-	28.0-83.0
	Nagy and Chang 2005	<35	-	66.0
	Munné et al., 2006	18-35	-	0.0-100.0
AMA	Kahraman et al., 2000	≥35	-	39.0
	Werlin et al., 2003	>38	-	53.7
	Munné et al., 2002	35-39	-	58.9
	Munné et al., 2002	40	-	65.1
	Gianaroli et al., 1997	≥38	-	63.0
	Staessen et al., 2004	≥37	-	63.2
	Platteau et al., 2005a	≥37	-	65.3
	Debrock et al., 2010	≥35	-	69.7
	Rubio et al., 2005	≥38	-	70.3
RM			Número de abortos	
	Vidal et al., 1998	≤35	≥4	41.0
	Platteau et al., 2005b	<37	≥2	43.8
	Munné et al., 2005	<35	≥3	57.0
	Pellicer et al., 1999	≤36	≥3	58.5
	Simón et al., 1998	<35	≥2	58.9
	Rubio et al., 2005	<37	≥2	63.5
	Platteau et al., 2005b	≥37	≥2	66.9
	Munné et al., 2005	≥35	≥3	67.0
	Werlin et al., 2003	-	≥2	68.2
	Garrisi et al., 2009	-	≥2	69.3
Rubio et al., 2003	<37 - ≥37	≥2	70.7	
Rubio et al., 2005	≥37	≥2	72.7	
RIF			Nº de fallos de implantación	
	Kahraman et al., 2000	-	≥2	49.0
	Gianaroli et al., 1997	-	≥2	57.0
	Rubio et al., 2005	<37	≥3	61.2
	Pehlivan et al., 2003	<37	≥3	65.4
	Wilton et al., 2003	-	Yes	67.0
	Werlin et al., 2003	-	>2	67.9
	Pehlivan et al., 2003	≥37	≥3	70.7
Rubio et al., 2005	≥37	≥3	71.5	
MF			Factor masculino severo	
	Rubio et al., 2005	-	Oligozoospermia	43.2
	Platteau et al., 2004	-	Azoospermia no obstructiva	52.5
	Rubio et al., 2005	-	Azoospermia Obstructiva	52.6
	Rubio et al., 2005	-	Teratozoospermia	55.9
	Silber et al., 2003	≤39	Oligozoospermia	58.0
	Platteau et al., 2004	-	Azoospermia Obstructiva	60.0
	Rubio et al., 2005	-	Azoospermia no obstructiva	69.7
	Silber et al., 2003	≤39	Biopsia testicular	78.0
Kahraman et al., 2004	-	Macrocefalia espermática	84.4	
Kahraman et al., 2004	-	Teratozoospermia absoluta	93.3	

AMA, edad materna avanzada; RM, abortos de repetición; RIF, fallo repetido de implantación; SMF, factor masculino; PAE, prevalencia de aneuploidías embrionarias.

Evaluación de la validez clínica de SCSA y PGS-FISH en el diagnóstico y tratamiento de la pareja estéril

Tabla 14. Estudios incluidos para el cálculo de los estadísticos de eficiencia diagnóstica para PGS-FISH y morfología embrionaria en la selección embrionaria

Estudios	Test	Gold Standard	Nº de blastómeras analizadas	VP	FP	FN	VN
Baltaci 2006	Morfología	FISH	1	150	115	274	437
Magli et al., 2007	Morfología	FISH	1	2978	1106	531	490
Munné et al., 2007	Morfología	FISH	1	1832	651	2401	1170
Rubio et al., 2007	Morfología	FISH	1 ó 2	1895	762	1417	1637
Ziebe et al., 2003	Morfología	FISH	Todas las blastómeras	41	34	7	21
Wilton et al., 2003	PGS-FISH	CGH	1	29.5	0.5	19.5	50.5
Kenskintepe et al., 2007	PGS-FISH	CGH	1	32.5	0.5	10.5	2.5
Daphnis et al., 2008	PGS-FISH	CGH	1 ó 2	17.5	0.5	10.5	3.5

VP, verdadero positivo; FP, falso positivo; FN, falso negativo; VN, verdadero negativo; FISH, hibridación in situ fluorescente; CGH, hibridación genómica comparada; PGS-FISH, diagnóstico genético preimplantacional con screening de aneuploidias mediante hibridación in situ fluorescente; Números entre paréntesis: intervalos de confianza.

2.2 Análisis estadístico

Los valores de los estadísticos de eficiencia diagnóstica calculados se muestran en la tabla 15 y 16. Se observó un valor significativamente mayor para PGS-FISH en especificidad, VPP, uVPP, uVPN, VPP-65 y VNP-65 comparado con la morfología embrionaria. El valor de LR- obtenido para morfología embrionaria fue 0.67 (CI: 0.53, 0.84), y para PGS-FISH fue 0.38 (CI: 0.29, 0.51) ($p < 0.05$). Para una prevalencia de aneuploidías embrionarias de 65% la probabilidad post-tets de aneuploidía embrionaria tras un resultado negativo (normal) de morfología embrionaria fue 55% (CI: 50-61%), y tras un resultado negativo (euploidía) de PGS-FISH fue 42% (CI: 35-49%) (Figura 26).

Tanto en los estudios de selección embrionaria mediante morfología como en los estudios PGS-FISH se observó una gran heterogeneidad (valores $I^2 > 50\%$).

Tabla 15. Estadísticos de eficiencia diagnóstica no relacionados con la prevalencia para PGS-FISH y morfología embrionaria en la selección embrionaria

	S	E	LR+	LR-	DOR
Ballaci 2006	0.35 (0.31, 0.40)	0.79 (0.76, 0.82)	1.70 (1.39, 2.08)	0.82 (0.75, 0.88)	1.59 (1.37, 1.84)
Magli et al., 2007	0.85 (0.84, 0.86)	0.31 (0.28, 0.33)	1.22 (1.19, 1.27)	0.49 (0.44, 0.54)	0.92 (0.82, 1.05)
Munné et al., 2007	0.43 (0.42, 0.45)	0.64 (0.62, 0.66)	1.21 (1.13, 1.30)	0.88 (0.84, 0.92)	0.49 (0.45, 0.52)
Rubio et al., 2007	0.57 (0.55, 0.58)	0.68 (0.66, 0.70)	1.80 (1.68, 1.92)	0.63 (0.60, 0.66)	1.15 (1.07, 1.24)
Ziebe et al., 2003	0.85 (0.74, 0.94)	0.38 (0.25, 0.52)	1.38 (1.09, 1.79)	0.38 (0.14, 0.81)	2.87 (1.35, 7.80)
<i>pooled</i>	0.61 (0.41, 0.81)	0.56 (0.39, 0.74)	1.44 (1.19, 1.73)	0.67 (0.53, 0.84)	1.10 (0.67, 1.81)
I^2	99.8	99.5	96.5	97.0	99.0
Wilson et al., 2003	0.60 (0.46, 0.74)	0.99 (0.99, 0.99)	61.62 (45.16, 82.96)	0.40 (0.26, 0.54)	2.59 (1.83, 4.68)
Kenskintepé et al., 2007	0.72 (0.63, 0.88)	0.83 (0.75, 0.94)	4.57 (1.45, 10.46)	0.29 (0.14, 0.59)	0.24 (0.04, 0.78)
Daphnis et al., 2008	0.63 (0.45, 0.81)	0.87 (0.75, 0.95)	5.04 (2.07, 11.83)	0.42 (0.21, 0.69)	0.33 (0.09, 1.18)
<i>pooled</i>	0.67 (0.57, 0.78)	0.91 (0.79, 1.02)	11.67 (1.59, 95.78)	0.38 (0.29, 0.51)	0.65 (0.12, 3.63)
I^2	33.5	87.4	95.8	0.0	86.9
P^*	NS	$p < 0.05$	NS	$p < 0.05$	NS

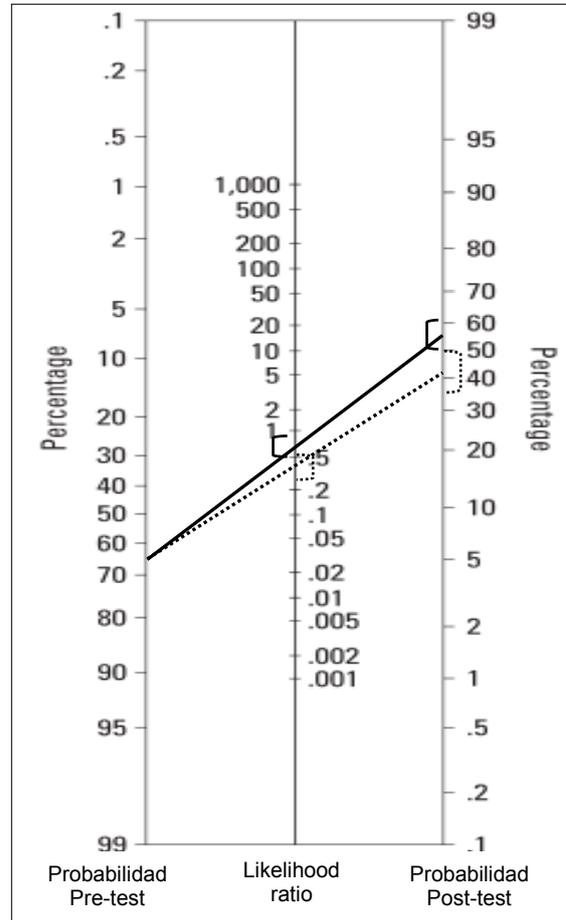
S, sensibilidad; E, especificidad; LR+, likelihood ratio positiva; LR-, likelihood ratio negativa; DOR, odds ratio diagnóstica; PGS-FISH, diagnóstico genético preimplantacional con screening de aneuploidias mediante hibridación in situ fluorescente; Números entre paréntesis: intervalos de confianza.

Tabla 16. Estadísticos de eficiencia diagnóstica relacionados con la prevalencia en la evaluación de la validez clínica del PGS-FISH vs. Morfología embrionaria en la selección embrionaria

	Prev	PPV	NPV	uPPV	uNPV	PPV-65	NPV-65
Baltaci 2006	424/976	0.57 (0.51, 0.62)	0.38 (0.35, 0.42)	0.59 (0.55, 0.62)	0.53 (0.52, 0.55)	0.76 (0.72, 0.79)	0.40 (0.38, 0.42)
Magli et al., 2007	3509/5105	0.73 (0.72, 0.74)	0.52 (0.49, 0.55)	0.53 (0.53, 0.54)	0.62 (0.60, 0.63)	0.69 (0.69, 0.70)	0.52 (0.50, 0.55)
Munné et al., 2007	4233/6054	0.74 (0.72, 0.75)	0.67 (0.66, 0.69)	0.53 (0.52, 0.54)	0.52 (0.51, 0.53)	0.69 (0.68, 0.71)	0.38 (0.37, 0.39)
Rubio et al., 2007	3312/5711	0.71 (0.69, 0.73)	0.46 (0.45, 0.48)	0.60 (0.59, 0.61)	0.58 (0.57, 0.58)	0.77 (0.76, 0.78)	0.46 (0.45, 0.47)
Ziebe et al., 2003	48/103	0.55 (0.43, 0.66)	0.25 (0.11, 0.44)	0.55 (0.51, 0.60)	0.66 (0.54, 0.79)	0.72 (0.67, 0.77)	0.58 (0.40, 0.79)
<i>pooled</i>		0.69 (0.65, 0.72)	0.47 (0.35, 0.59)	0.56 (0.53, 0.59)	0.57 (0.53, 0.61)	0.73 (0.69, 0.76)	0.45 (0.39, 0.50)
I^2		90.3	99.1	96.5	97.8	96.8	97.8
Wilton et al., 2003	49/100	0.02 (0.01, 0.02)	0.27 (0.17, 0.38)	0.95 (0.93, 0.96)	0.65 (0.60, 0.71)	0.99 (0.99, 0.99)	0.57 (0.50, 0.67)
Kenskintepete et al., 2007	43/46	0.01 (0.01, 0.02)	0.83 (0.05, 0.94)	0.73 (0.56, 0.83)	0.70 (0.60, 0.81)	0.89 (0.73, 0.95)	0.65 (0.48, 0.79)
Daphnis et al., 2008	28/32	0.03 (0.02, 0.04)	0.77 (0.07, 0.93)	0.75 (0.62, 0.84)	0.64 (0.57, 0.74)	0.90 (0.79, 0.96)	0.56 (0.44, 0.72)
<i>pooled</i>		0.02 (0.01, 0.02)	0.58 (0.16, 1.00)	0.82 (0.65, 0.98)	0.65 (0.61, 0.70)	0.94 (0.87, 1.02)	0.58 (0.52, 0.65)
I^2		67.8	79.9	90.6	0.0	73.0	0.0
P*		p<0.01	NS	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05

VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; uVPP, valor predictivo positivo no condicionado; uVPN, valor predictivo negativo no condicionado; VPP-65, valor predictivo positivo a prevalencia fija del 65%; VPN-65, valor predictivo negativo a prevalencia fija del 65%.

Figura 26. Nomograma de Fagan utilizando el valor de likelihood ratio negativo y la probabilidad pre-test para PGS-FISH y morfología embrionaria.



Líneas continuas: morfología embrionaria; líneas discontinuas: PGS-FISH. Llaves: intervalos de confianza.

2.3 Validez clínica del modelo teórico de Los et al. (2004).

Para el modelo teórico de Los et al. (2004) el valor de LR- obtenido fue 0.31 para el análisis de una blastómera y 0.21 para el análisis de 2 blastómeras (Tabla xx). Para un probabilidad pre-test de aneuploidía embrionaria de 65%, la probabilidad post-test de aneuploidía embrionaria tras un resultado negativo para el modelo teórico fue 36% para biopsia de una blastómera y 28% para la biopsia de 2 blastómera.

Tabla 17: Estadísticos de eficiencia diagnóstica no relacionados con la prevalencia para el modelo teórico de Los et al., (2004)

	VP	FP	FN	VN	S	E	LR-	Probabilidad Post-test
1 blastómera	42417	544	18178	21361	0.70	0.97	0.31	0.63
2 blastómeras	47962	1475	11702	21361	0.80	0.93	0.21	0.72

VP, verdadero positivo; FP, falso positivo; FN, falso negativo; VN, verdadero negativo; S, sensibilidad; E, especificidad; LR-, likelihood ratio negativa.

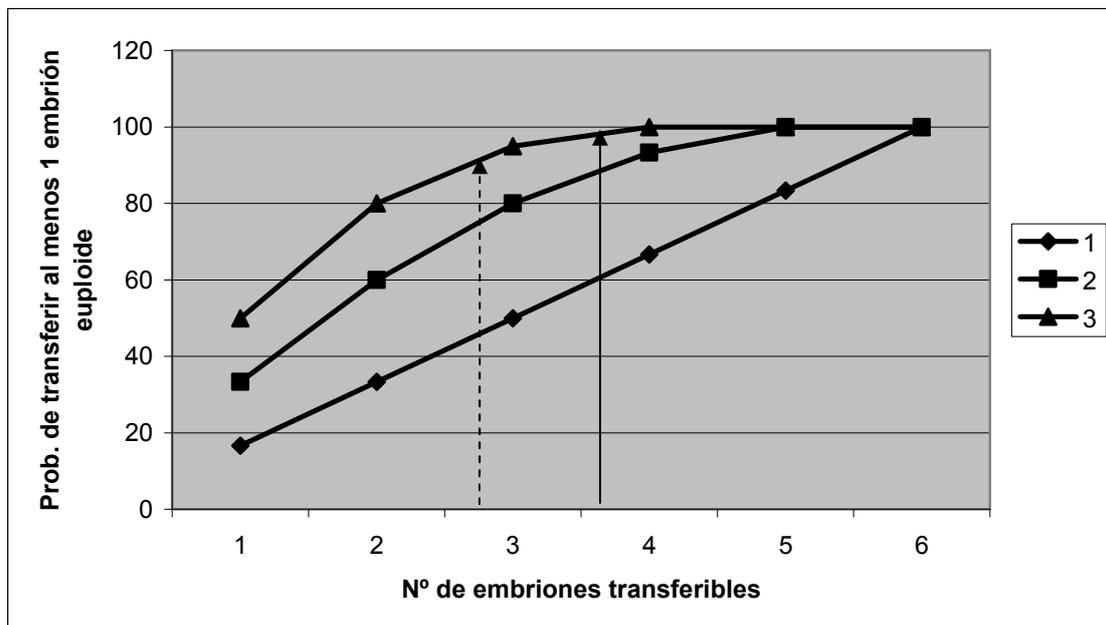
2.4 Influencia del método de selección embrionaria en la probabilidad de transferir al menos un embrión euploide.

En el modelo de distribución hipergeométrica (Figure 26), partiendo de la probabilidad post-test de seleccionar un embrión euploide mediante morfología embrionaria del 45% (CI: 39-50%) y mediante PGS-FISH del 58% (CI: 51-65), resulta: primero, que la probabilidad de transferir al menos 1 embrión euploide aumenta con el porcentaje de embriones óptimos en la cohorte y con el número de embriones escogidos. Segundo, que ese aumento es cada vez menos pronunciado a partir del 50% de embriones euploides en la cohorte. Tercero, que la probabilidad de

transferir al menos un embrión euploide es igual si se transfieren 2 embriones seleccionados mediante PGS-FISH o 3 embriones seleccionados mediante morfología embrionaria (flechas en Figura 27).

Asimismo para que cualquier test de selección embrionaria tenga mayor validez clínica que la morfología embrionaria debería tener un valor de LR- de 0.40 (CI: 0.32, 0.51) en SET y 0.06 en DET (CI: 0.05, 0.07).

Figura 27. Probabilidad de transferir al menos un embrión euploide según el número de embriones óptimos en una cohorte de 6 embriones transferibles y según el número de embriones transferidos.



Las flechas indican la probabilidad de embrión euploide con un test de morfología normal (flecha discontinua) o con un test de PGS-FISH euploide (flecha continua).

Discusión

La esterilidad afecta al 15% de las parejas en edad fértil, estimándose que en España afecta a unas 600.000 parejas (Matorral and Hernández, 2007). El factor masculino está presente, como factor único o asociado, en un 40-50% de los casos de esterilidad. Su estudio inicial se basa en la anamnesis y el estudio de los parámetros clásicos de semen (concentración, movilidad y morfología espermática) (Practice Committee ASRM, 2007; NICE, 2004; ICSI, 2004; EAU, 2008; The ESHRE Capri Workshop, 1996). Diferentes factores, como su elevada variabilidad biológica y analítica, limitan la utilidad clínica del análisis de estos parámetros (Castilla et al., 2006). Por ello, la utilidad y eficiencia de los parámetros clásicos de semen han sido cuestionadas y otros tests seminales han sido sugeridos, como aquellos relacionados con la fragmentación del DNA espermático (entre los que se encuentra el SCSA).

Por otra parte, las técnicas de reproducción asistida juegan un papel clave en el tratamiento de la esterilidad. Éstas van encaminadas a facilitar la fecundación del ovocito, pudiendo realizarse diferentes técnicas de reproducción asistida en función de la patología de la pareja: IA, FIV o ICSI. En las dos últimas la selección embrionaria tiene un valor primordial para conseguir el éxito de la técnica. Esta selección se lleva a cabo rutinariamente mediante la morfología embrionaria, aunque en determinados situaciones clínicas (AMA, RM, RIF, MF) se ha sugerido la realización de otros tests más avanzados de selección embrionaria entre los que se encuentra el PGS-FISH.

Sin embargo, antes de introducir cualquier test en la práctica diaria su validez clínica debe ser comparada con la de aquellos métodos ya existentes (Bossuyt *et al.*, 2000). Por ello, en este estudio nos propusimos evaluar y comparar la validez clínica de: el SCSA y los CSP en el diagnóstico de la esterilidad por factor masculino, y de la morfología

embrionaria y el PGS-FISH en la selección embrionaria, con el fin de comprobar si la introducción de los nuevos tests en la práctica clínica van a aportar más información o van a cambiar la actitud terapéutica.

1. Evaluación clínica del SCSA y los parámetros clásicos de semen en el diagnóstico del factor masculino

Como ya se ha comentado en la Introducción, para realizar el proceso de evaluación de un test diagnóstico es necesario el uso de las tablas 2x2 (Figura 15), de la que derivan los atributos de un test conocidos como estadísticos de eficiencia diagnóstica. Cuando estas tablas son aplicadas al campo de la esterilidad normalmente son mal interpretadas, debido principalmente a 3 motivos.

Por una parte, algunos autores han considerado un test positivo si el resultado es normal (Arslan, *et al.*, 2006; Jeyendran and Zaneveld, 1993), mientras que otros autores lo consideran positivo si es anormal (Sergerie *et al.*, 2005). En el presente estudio, hemos seguido los criterios publicados por STARD, según los cuales un resultado positivo es denominado anormal (Bossuyt *et al.*, 2003).

Por otra parte, dependiendo de la enfermedad y del uso del test (diagnóstico o screening) los clínicos necesitan que determinadas características del test sean más elevadas, es decir, que dicho test tenga por ejemplo más sensibilidad o más especificidad. En el caso de los test diagnósticos de esterilidad de factor masculino, el test debe de tener el menor número posible de falsos positivos (hombres fértiles diagnosticados por el test como estériles). Esto se debe en primer lugar a una razón fisiopatológica descrita por Jeyendran y Zanevel en 1993. Los falsos negativos en el diagnóstico de la esterilidad por factor masculino no

son importantes, porque cuando un único test aporta un resultado normal no significa ni implica que otros defectos no estén presentes. La característica evaluada por el test es solo una de la multitud de factores que determinan la fertilidad. Por esta razón los test diagnósticos de esterilidad por factor masculino normalmente presentan bajos niveles de sensibilidad. Sin embargo, un falso positivo en un test diagnóstico de la esterilidad por factor masculino indica que el parámetro analizado no es realmente importante, incluso cuando es anormal se puede ser fértil. La segunda razón podría denominarse “razón clínica”. Desde un punto de vista clínico parece más aceptable diagnosticar a hombres estériles como fértiles (falsos negativos) que diagnosticar a hombres fértiles como estériles (falsos positivos). Esta aproximación prevendría el sobretreatmento de hombres potencialmente fértiles, evitando, por ejemplo, remitir parejas a ICSI cuando podría haber sido empleado otro tratamiento menos agresivo (Sergerie et al., 2005).

Y por último, los tests diagnósticos de esterilidad por factor masculino, por las “razones clínicas” mencionadas, deben tener el menor número de falsos positivos que implica un alto VPP y una elevada LR+. Respecto al VPP, depende de forma crucial de la población elegida y de la prevalencia de la enfermedad en ella, y en este sentido, el VPP es mayor cuanto mayor es la prevalencia. Esto significa que las diferencias entre los estudios que analizan la validez clínica de los tests diagnósticos pueden estar causadas por diferencias en las tasas de prevalencias, y no por verdaderas diferencias en la validez del test realizado. Para una comparación apropiada de los VP, en este estudio hemos usado las siguientes estrategias: la estimación del valor predictivo a una determinada prevalencia y cálculo de uVP (valores predictivos no condicionados). A diferencia del VP la LR es independiente de la prevalencia de la enfermedad, y cuanto más grande sea la LR+ mayor

será la probabilidad de esterilidad por factor masculino cuando se produce un resultado positivo del test. En concordancia con lo comentado anteriormente, un test diagnóstico ideal de esterilidad de factor masculino debe ser capaz de detectar esterilidad masculina, es decir, debe tener una alta LR+.

1.1 Relaciones naturales

En este escenario clínico, sólo la Especificidad “pooled” mostraba diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.001$), siendo mayor en el SCSA que en los CSP. Aunque no se observaron diferencias significativas en VPP ni VPN, es preciso mencionar que los estudios incluidos en nuestro análisis “pooled” para comparar la validez clínica del SCSA y del CSP en parejas que buscan embarazo mediante relaciones naturales presentaban diferentes prevalencias de esterilidad. Estas discrepancias pueden ser debidas a que los estudios destinados a la evaluación de la validez clínica de un test en parejas que buscan embarazo mediante relaciones naturales tienen que ser prospectivos, y en estos estudios la prevalencia de no embarazo va a depender del tiempo de seguimiento, con un rango del 20 al 40% a los 6 meses y del 10 al 15% a los 12 meses. La influencia de las diferentes prevalencias en los falsos positivos ha sido discutida por Van der Steeg *et al.* (2005), que demostró que el adelanto de los test espermáticos implicaría el diagnóstico de un elevado porcentaje de parejas como estériles que quedarían gestantes en los próximos meses. Esto significa que se aplicarían a estas parejas técnicas de reproducción asistida innecesarias. Esta conclusión se confirma con el hecho de haber encontrado que son mayores las tasas de embarazo espontáneo en parejas remitidas por un médico general a un centro secundario que en parejas remitidas por un ginecólogo a un centro

terciario o unidad de reproducción especializada (Wouts *et al.*, 1987; Snick *et al.*, 1997).

1.2 Fértiles vs. estériles

En este escenario clínico el VPP “pooled” fue mayor para el SCSA y el VPN “pooled” fue mayor para los CSP, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas en la LR+ ni en la probabilidad post-test de esterilidad por factor masculino. Además, en este escenario clínico se observa una elevada heterogeneidad ($I^2 > 50$) entre los estudios incluidos, que puede estar relacionada con tres puntos: la gran diversidad terminológica en la definición de la esterilidad, las diferencias metodológicas y las diferencias en los puntos de corte. Respecto a las diferencias terminológicas a la hora de definir la esterilidad, se han aplicado los siguientes criterios: población general estériles (no se descartaba claramente el factor femenino) (Ombelet *et al.*, 1997); parejas estériles en las que la mujer presentaba el estudio básico de esterilidad normal (Bartoov *et al.*, 1993; Guzitz *et al.*, 2001; Saleh *et al.*, 2002; Nallella *et al.*, 2006); y oligozoospermicos estériles (Menkveld *et al.*, 2001). Estas discrepancias en las definiciones entre estudios puede explicar la heterogeneidad de los resultados reportados en este escenario.

En segundo lugar, puede que la heterogeneidad encontrada entre los diferentes estudios sea indicativo de las diferencias metodológicas que se están aplicando. Coppus *et al.* (2006) demostró que la mayoría de los estudios publicados sobre exactitud de los tests diagnósticos en medicina reproductiva tienen errores metodológicos en el diseño o análisis, o bien aportan resultados con un limitado uso práctico. En tercer lugar, la elevada heterogeneidad observada entre los estudios puede deberse al uso de diferentes puntos de corte (Dinnes *et al.*, 2005). El escaso número

de estudios incluidos en los diferentes escenarios nos impidió llevar a cabo un análisis de meta-regresión. Sin embargo, la técnica que hemos aplicado para calcular los atributos “pooled” del test es la que menos se afectada por la heterogeneidad entre los estudios (Dersimonian and Laird, 1987).

Por otro lado, un factor clave a la hora de interpretar los resultados de los estudios sobre validez clínica de dos tests es aplicar ambos tests a la misma población. De todos los estudios analizados, solo en uno (Saleh et al., 2002) realizan esta comparación directa, por lo que ha sido imposible realizar estudios estadísticos potentes en este sentido en la evaluación de pruebas diagnósticas como los descritos por Biggerstaff (2000) y Roldan-Nofuentes (2007).

Cuando comparamos Fértiles vs. estériles en estudios de caso-control, la prevalencia de esterilidad por factor masculino se sitúa en el 50%. Hay que tener en cuenta que la mayor utilidad de los tests se presenta cuando la prevalencia de enfermedad es de 50% (los cambios numéricos en la columna post-test del nomograma de Fagan son mayores cuando el punto de partida en la columna pre-test está en el 50% que cuando está en otro punto). Muchos test seminales han sido analizados para tasas de prevalencias alrededor del 50%, en la que el rendimiento del test se maximiza (Sergerie et al., 2005; Jedrzejczak et al., 2008). Sin embargo, en nuestro análisis de estudios de diseño caso-control, aun siendo la prevalencia del 50%, no se observan mayores beneficios clínicos del SCSA frente a los CSP.

El análisis de semen está incluido en la mayoría de los modelos utilizados para predecir el embarazo espontáneo en parejas estériles (Eimers et al., 1994; Collins et al., 1995; Hunault et al., 2004). Sin

embargo, la realización de estudios aleatorizados con este objetivo plantea dilemas éticos, pues el retraso en la atención a estas parejas conlleva una reducción de las posibilidades de éxito. Algunos autores han planteado estos estudios, pero sólo con parejas con factor masculino (Van Zyl and Menkveld, 2006; Osmanagaoglu *et al.*, 2002; Eggert-Kruse *et al.*, 1996; Kruger and Coetzee, 1999), lo que significa que la prevalencia de esterilidad masculina en este grupo de parejas es diferente de aquella existente entre las parejas estudiadas en la práctica clínica diaria en las clínicas de reproducción humana.

Otros autores han designado estudios de caso-control para evitar estas dificultades. Una de las desventajas de los estudios caso-control es que no permiten calcular la prevalencia de la enfermedad; por el contrario el investigador debe de establecer este valor. Los estudios caso-control sufren normalmente sesgo de selección. Este sesgo implica que la capacidad reproductiva de las parejas incluidas en los estudios caso-control es más extrema que entre las parejas estériles que acuden a nuestras unidades de reproducción. Esto significa que existe mayor capacidad reproductiva entre los controles y menos entre los casos en los estudios caso-control. Se estima que el efecto de este sesgo representa un incremento de al menos tres veces más en la capacidad del test (Horvath and Pewsner 2004; Moons and Grobbee 2002).

Al igual que en el escenario clínico anterior, en éste (grupo de varones de parejas fértiles vs. varones de parejas estériles por factor masculino) los estudios deberían ser prospectivos. Sin embargo, nuestro análisis sólo incluye estudios de diseño caso-control debido a la ausencia de estudios prospectivos en este escenario como se ha comentado anteriormente.

1.3 Reproducción asistida

Para analizar la validez clínica de un test en parejas tratadas con IUI es necesario determinar la magnitud de cambio de la sospecha inicial del clínico de gestación utilizando IUI a la probabilidad de gestación con IUI después del resultado del test (probabilidad post-test). En los programas de IUI la probabilidad pre-test de no embarazo en la población estéril general se encuentra alrededor del 85% (Nyboe Andersen *et al.*, 2008; Ombelet *et al.*, 2002; González *et al.*, 2007). Esta alta prevalencia significa que aunque uPPV, VPP-85 y la LR+ son mayores para el SCSA que para la morfología espermática, las diferencias entre ambos tests en las probabilidades post-test de no embarazo tras un resultado positivo (anormal) haciendo IUI no son muy grandes en términos clínicos. Dichas probabilidades post-test equivalen al 97% después de un resultado anormal para el SCSA y 91% después de un resultado normal para morfología espermática.

La población incluida en los estudios de SCSA e IUI eran parejas con esterilidad de origen desconocido, mientras que en los estudios de morfología espermática e IUI era población general. Estas poblaciones son diferentes y no comparables. Sin embargo, no existen estudios que se centren solo en CSP para parejas con esterilidad de origen desconocido tratadas con IUI, ya que en las parejas de esterilidad de origen desconocido los CSP sestarán dentro de los valores de referencia. No obstante, desconocemos si otras variables, más económicas y fáciles de realizar, como concentración espermática después de la preparación del semen o el número de espermatozoides móviles inseminados pueden ser útiles en la predicción del resultado de IUI en parejas con esterilidad de origen desconocido, como otros autores han observado en la población general de parejas estériles tratadas con IUI (Branigan *et al.*,

1999; Merviel *et al.*, 2008; Royère *et al.*, 2004; Van Voorhis *et al.*, 2001). En nuestra opinión, antes de recomendar el uso del SCSA en parejas que están en tratamiento de IUI por esterilidad de origen desconocido, es obligado comparar su validez clínica con la de otros tests espermáticos funcionales (económicos y fáciles de realizar e interpretar), como el test hipoosmótico (Check 2005; Misro and Chaki, 2008) o el test de supervivencia espermática (Branigan *et al.*, 1999).

A modo de resumen de nuestros resultados podemos decir que la LR+ pooled obtenida con el SCSA en los 3 escenarios clínicos descritos varía desde 3.94 a 6.13, lo que significa que el incremento de la probabilidad de esterilidad por factor masculino o de no embarazo después de IUI sólo se puede clasificar como pequeño o moderado. Se considera que una LR+ representa un incremento decisivo en la probabilidad de la enfermedad cuando su valor es >10 (Jaescheke *et al.*, 2002). Este resultado nos conduce a discrepar con Evenson and Wixon (2008), y a no recomendar el uso del SCSA como un test de rutina en la esterilidad por factor masculino, estando de acuerdo con las “guidlines” de la Asociación Americana de Medicina Reproductiva que lo desaconsejan (Practice Committee of ASRM, 2006). Estos autores han presentado el test de fragmentación del DNA como un test de “infertilidad”, el cual puede diagnosticar esterilidad por factor masculino (Evenson and Wixon, 2006). Evenson and Wixon (2008), basaron sus conclusiones en cálculos de la odds ratio (OR) de dos estudios (Evenson *et al.*, 1999; Spano *et al.*, 2000), proponiendo el SCSA como un test pronóstico del embarazo mediante relaciones naturales. Como se ha indicado en la introducción la OR es el cociente entre el valor de la LR+ y la LR-, por lo que se pueden encontrar valores altos de OR debida a bajas LR- con valores moderados o bajos de LR+. Niederberger (2003) y Sackett *et al.* (1996) desaconsejan el uso de la OR para la comparación de tests diagnósticos y diferentes autores han

preferido el uso de LR en lugar de la OR para determinar la validez clínica de un test (Dujardin *et al.*, 1994; Biggerstaff, 1999; Roldan-Nofuentes and Luna del Castillo, 2007). Nosotros creemos, por las razones ya citadas, que esta decisión debe estar basada en el cálculo y análisis de LR+ y no en la OR.

Por otra parte, existen diferentes estrategias para incrementar la validez diagnóstica de un test antes de ser reemplazado por otro de utilidad no probada. En primer lugar, disminuir los valores de referencia de la variable que está siendo analizada con el test diagnóstico. De esta manera, cuando un resultado del test es anormal podemos estar más seguros de que una alteración seminal es responsable de la esterilidad y por tanto la pareja requiere técnicas de reproducción. Por ello diferentes autores sugirieron la revisión de los límites inferiores de referencia de la penúltima edición del manual de la OMS para análisis de semen (WHO 1999) (Guzick *et al.*, 2001; Haugen *et al.*, 2006; Nallella *et al.*, 2006). en el manual de la OMS editado recientemente (WHO, 2010) estos límites inferiores de referencia son considerablemente más bajos que los recomendados en la edición previa, lo que hace que aumente la especificidad de dichos parámetros.

En segundo lugar, cuanto mayor sea la probabilidad pre-test de la enfermedad mayor será la probabilidad post-test, independientemente de que el resultado del test sea normal o anormal. Por lo tanto, una evaluación precisa de las causas de la enfermedad o desorden van a ser más importantes que la LR derivada de tests diagnósticos caros. Cuando un test diagnóstico se aplica a una población con una alta prevalencia de esterilidad por factor masculino (por ejemplo cuando existen antecedentes de quimioterapia), la tasa de falsos positivos va a ser menor que cuando el mismo test se aplica a una población con una baja prevalencia de

esterilidad por factor masculino (por ejemplo parejas que buscan embarazo). Así, cuando se obtiene un resultado anormal en pacientes que, por ejemplo, han recibido quimioterapia, el VPP del test es mayor y podemos estar más seguros de que la esterilidad por factor masculino se encuentra involucrada en la esterilidad de la pareja.

En tercer lugar, utilizar intervalos de LR. Los clínicos asumen intuitivamente que es más probable que un hombre con un recuento espermático de 1 millón/mL que ha estado intentando concebir durante 12 meses sin éxito presente esterilidad por factor masculino que aquel que tiene un recuento de 14 millones/mL (incluso cuando ambos valores son inferiores a los límites de referencia del manual de la OMS). El cálculo de la LR por intervalos ayuda a los clínicos a cuantificar las diferencias de los efectos diagnósticos que intuitivamente se reconocen. Se calcula un LR separado para cada nivel (intervalo) del resultado del test, y este intervalo de LR aporta información clínica más útil que cuando el dato se presenta en un formato dicotómico (Brown and Reeves, 2003; Grimes and Schulz, 2005). En este sentido, varios autores han propuesto el uso de diferentes puntos de corte en lugar de un único valor para cada parámetro de semen, que supuestamente distingue entre normal y anormal (Alvarez et al., 2003; Guzick *et al.*, 2001; Overstreet and Davis, 1995; Björndhal et al., 2010).

2. Evaluación de la validez clínica del PGS-FISH y la morfología embrionaria

Para realizar la evaluación de estos tests se llevó a cabo una revisión sistemática con el fin de estimar la prevalencia de aneuploidías embrionarias y comparar los estadísticos de eficiencia diagnóstica del PGS-FISH y la morfología embrionaria.

Respecto a la prevalencia, en nuestra revisión sistemática hemos encontrado grandes diferencias en la probabilidad pre-test de aneuploidías embrionarias entre los estudios incluidos. Estas diferencias se encuentran tanto en las diferentes situaciones clínicas analizadas (AMA, RM, RIF and MF) como en los estudios de embriones que proceden de ovocitos de donantes. Dichas variaciones en el valor de la prevalencia pueden ser debidas a varios factores. En primer lugar, a diferentes criterios utilizados en los distintos artículos para definir cada grupo de estudio. Así, Staessen et al. (2004) y Platteau et al. (2005) definen AMA como pacientes con edad materna ≥ 37 años, mientras que Kahraman et al. (2000) incluye mujeres con 35-39 años y Munné et al. (2003) o Debrock et al. (2008) aceptan en este grupo a mujeres a partir de 35 años de edad.

En segundo lugar, la hibridación in situ fluorescente permite analizar entre 7 y 12 cromosomas, incluyendo aquellos que se encuentran involucrados en las aneuploidías más comunes en los abortos espontáneos y aquellos de acuerdo con la historia clínica de la paciente (The Practice Committee, 2007). Pero no todos los estudios utilizan las mismas sondas. Así, los estudios más antiguos analizan los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y (Pellicer et al. 1999; Vidal et al., 1998; Simón et al., 1998), mientras que en estudios más recientes algunos autores incluyen también los cromosomas 15 y 17 (Werlin et al. 2003; Munne et al. 2005; Garrisi et al., 2008). Hellani et al. (2008) encontraron que el porcentaje de embriones con anomalías en otros cromosomas, tales como 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 15, 17 y 20, alcanza el 60 %.

En tercer lugar, las grandes discrepancias pueden deberse a las controvertidas tasas de reproducibilidad, exactitud y mal diagnóstico del PGS-FISH (Wilton et al. 2003; Gleicher et al. 2008). Entre las causas que

motivan estas controversias están por una parte las ya comentadas de tipo técnico y por otra parte las de tipo fisiológico. Es bien conocida la existencia de mosaicismo cromosómico en estadios tempranos de desarrollo embrionario (Ruangvutilert *et al.* 2000; Gonzalez-Merino *et al.* 2003; Coonen *et al.* 2004; Bielanska *et al.* 2005; Baart *et al.* 2006). Al menos el 40-50% de los embriones humanos presentan mosaicismo cromosómico y algunos de ellos en tal medida que son considerados mosaicos caóticos (Daphnis *et al.* 2008). Esto implica que la blastómera biopsiada mediante el PGS-FISH puede no representar al resto del embrión, resultando el diagnóstico en falso positivo o falsos negativo. Esto no es un error de diagnóstico per se, ya que el resultado de la blastómera biopsiada es correcto pero diferente al resto del embrión. Es por tanto una limitación intrínseca al PGS-FISH. Por ello algunos laboratorios biopsian y analizan 2 células en un esfuerzo por detectar el mosaicismo. Aunque así aumenta la información proporcionada, en las células que quedan en el embrión puede seguir existiendo mosaicismo que no será detectado y además la viabilidad del embrión al biopsiar 2 células puede verse mermada (Cohen *et al.* 2007; Goossens *et al.* 2008).

Recientemente, Vanneste *et al.* (2009) han observado mediante CGH que sólo el 9% de los embriones humanos en etapas tempranas del desarrollo son cromosómicamente normales en todas sus blastómeras. Por otro lado, se ha observado también que el mosaicismo en etapas tempranas del desarrollo embrionario puede resultar en un embrión viable (Munne *et al.* 2006). Esta viabilidad embrionaria surge como consecuencia de la capacidad de autocorrección del embrión en estadios más avanzadas, la apoptosis de la blastómera aneuploide o la disposición de dicha blastómera en el trofoectodermo durante la formación del blastocisto (Magli *et al.* 2000; Voullaire *et al.* 2000; Sandalinas *et al.* 2001; Derhaag *et al.* 2003; Trussler *et al.* 2004; Verjalav *et al.*, 1989). Estos

hallazgos hacen cuestionar si algún embrión es cromosómicamente uniforme y normal en estas etapas tempranas de desarrollo embrionario humano y si es necesaria esta uniformidad en todas sus blastómeras para originar un embarazo viable (Daphnis et al. 2008).

No obstante, aunque las discrepancias que hemos encontrado la prevalencia de aneuploidías embrionarias entre los estudios incluidos son elevadas, hemos encontrado una gran similitud de nuestra mediana y el valor de aneuploidías embrionarias obtenido por el European Society of Human Reproduction and Embriology Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium (2009) (65 vs. 64%). Cuando comparamos los valores de prevalencia para RIF, RM and MF por separado, nuestros resultados son también muy similares (62 % vs. 63%, 66% vs. 63 and 59% vs. 57% respectivamente). Sin embargo los valores de prevalencia en AMA son más dispares: 63% en nuestro estudio frente al 72% obtenido por The European Society of Human Reproduction and Embriology Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium (2009). Estas diferencias pueden ser debidas a las discrepancias ya comentadas en la definición de AMA.

Por otro lado, para comparar los estadísticos de eficiencia diagnóstica de la morfología embrionaria y el PGS-FISH, solo hemos incluido estudios que comparaban la FISH con la CGH en el PGS-FISH. La exclusión de estudios que utilizaban como gold standard los resultados obtenidos mediante rondas posteriores de FISH (Munne et al. 1998; Silber et al. 2003; DeUgarte et al. 2008) se debe a que dichos estudios pueden estar cometiendo sesgos de incorporación. El sesgo de incorporación se produce cuando el resultado del test experimental (primera ronda de FISH) es combinado con el resultado del test de referencia y forma parte del gold standard (rondas de FISH posteriores). Este sesgo origina una

sobreestimación de la eficacia del test, ya que el test experimental y el test de referencia son parcialmente idénticos.

Por otra parte, la exclusión de estudios que analizan el embrión en estadios más avanzados del desarrollo (Baart et al. 2004; Staessen et al. 2004; Baart et al. 2006; Michiels et al. 2006) se debió a que dicho estudios pueden cometer sesgo de revisión, que también ha sido denominado sesgo de diagnóstico no ciego. Este sesgo se produce cuando el test de referencia es interpretado con conocimiento del resultado del test experimental. Esto puede llevar a la sobreestimación tanto de la sensibilidad como de la especificidad, especialmente si la interpretación del resultado es hasta cierto punto subjetiva (Knotternus 2002).

Respecto a los estadísticos de eficiencia diagnóstica deseables en un tests de selección embrionaria, el número de FN debe ser bajo (embriones anormales considerados normales con el test) y en consecuencia, el VPN elevado y la LR- baja (Dressen et al., 2008). Esto se debe a que a un test negativo de selección embrionaria debe garantizar al máximo que los embriones que se transfieren sean normales. La relación inversa que existe entre VPN y la prevalencia en cualquier test de screening podría explicar diferentes resultados de nuestro estudio y de otros autores. En primer lugar, y dado el amplio rango de prevalencia de aneuploidías embrionarias comentado, explicaría las diferencias en los VPN encontrado entre los diferentes estudios. Nosotros hemos demostrado que estas discrepancias entre estudios disminuyen cuando se calculan estadísticos relacionados con valores predictivos que no se ven afectados por la prevalencia (uVPN y VPN-65).

En segundo lugar, explicaría la observación de diferentes autores (Staessen *et al.* 2004; Twisk *et al.* 2008; Staessen *et al.*, 2007;) de que el PGS-FISH funciona relativamente mejor en mujeres con baja tasa de aneuploidías embrionarias (ej. mujeres jóvenes) que en mujeres con alta tasa de aneuploidías embrionarias (ej. AMA). Además el modelo teórico de Summer and Foland (2009) demostró que la ganancia del PGS-FISH es marginal con mayores tasas de aneuploidía (>70%), incluso cuando existe un elevado número de embriones biopsiables.

Las diferencias estadísticas encontradas en nuestro análisis pooled demuestran una mayor eficiencia en selección embrionaria del PGS-FISH (LR-: 0.38) que de la morfología embrionaria (LR-: 0.67). No obstante, la eficiencia diagnóstica observada en el PGS-FISH no alcanza la propuesta por el modelo teórico de Los *et al.*, (2004) (LR-: 0.31). Esto puede ser debido a las ya comentadas limitaciones del PGS-FISH, que podrían ser en parte superadas con el uso de CGH (Kallioniemi *et al.* 1992). La CGH es un método alternativo a la FISH que no requiere la preparación de los cromosomas de la muestra y en un único experimento revela el número de copias de cada segmento cromosómico de más de 10MN de tamaño, siendo extremadamente útil para medir niveles de aneuploidía y mosaicismo en embriones preimplantacionales (Wells & Delhanty 2000). Sin embargo, existen dos factores que pueden limitar la incorporación del CGH en reproducción asistida. El primero es la necesidad de que transcurra un largo período de tiempo (varias semanas) para obtener resultados completos de la blastómera, impidiendo la capacidad de realizar transferencias frescas de blastocistos. El segundo factor limitante es el aspecto tecnológico y de costes requeridos en el análisis mediante la CGH para introducir su práctica en la gran mayoría de centros de FIV. Bajo estas circunstancias, la principal cuestión es si clínicamente es posible y beneficioso aplicar CGH en día 3 de desarrollo embrionario

teniendo en cuenta la necesidad de realizar un ciclo posterior con transferencia de embriones descongelados (Trussler *et al.* 2004; 2007; Sher *et al.* 2009; The Practice Committee, 2007). De manera alternativa, la CGH con microarray ha sido aplicada con éxito para la detección de aneuploidías en una célula tras amplificación del genoma mediante DOP-PCR o un método alternativo conocido como “multiple displacement amplification” (Hu *et al.* 2004). Esta aproximación permite realizar un análisis de los cromosomas en menos del 48 horas, pudiendo realizar la transferencia embrionaria en fresco sin necesidad de criopreservación (Wells *et al.* 2008).

Sin embargo, y a pesar del avance que supone el CGH o Microarray-CGH, no debemos olvidar que desde un punto de vista teórico el estadio de 8 células no es el más adecuado para realizar el PGS debido a la baja tasa de embriones normales y a la alta tasa de embriones anormales y mosaicos que se presentan en este momento del desarrollo embrionario. De acuerdo con Los *et al.* (2004), cuando se biopsian embriones en estos estadios de desarrollo dada la alta probabilidad de mosaicismo, la biopsia de una célula anormal podría reducir o incluso eliminar el mosaicismo del embrión, pero disminuye su posibilidad de transferirlo. Por el contrario, la biopsia de una célula normal podría aumentar el mosaicismo en el embrión al mismo tiempo que aumentaría la posibilidad de transferirlo. Este aspecto llevaría al efecto paradójico de una relación inversa entre el potencial de desarrollo del embrión y su probabilidad de ser transferido.

Como se observa en nuestros resultados, la mayor utilidad del PGS-FISH en la selección de embriones euploides va disminuyendo al aumentar el número de embriones transferidos (Figura xxx). De esta manera, existe una probabilidad muy similar de transferir al menos un

embrión euploide cuando se transfirerem 3 embriones seleccionados mediante morfología embrionaria que cuando se transfieren 2 embriones seleccionados mediante PGS-FISH. Esta relación inversa entre el número de embriones transferidos y el beneficio del PGS-FISH frente a la morfología embrionaria coincide con los resultados obtenidos por Donoso *et al.*, (2006). Estos autores compararon en varones azoospermicos cómo la selección embrionaria basada solo en criterios del desarrollo y morfología embrionaria con la selección embrionaria basada en el resultado del PGS-FISH. En este estudio concluyen que la probabilidad de transferir un embrión euploide seleccionado solo por criterios morfológicos es del 60%. Pero cuando se transfieren 2 embriones utilizando solo criterios morfológicos, esta probabilidad aumenta al 80%, suponiendo una disminución de la ganancia que aportaría el PGS-FISH. Como ya hemos comentado, esta reducción de la ganancia del PGS-FISH conforme aumenta el número de embriones transferidos es similar a la reportada en nuestro estudio.

Los nuevos tests no invasivos de viabilidad embrionaria deberán garantizar un elevado rendimiento diagnóstico para tener más validez clínica que la morfología embrionaria o el PGS-FISH. Entre los métodos de análisis de la calidad embrionaria no morfológicos se encuentra la transcriptómica, proteómica y metabolómica (Brison *et al.* 2007; Katz-Jaffe *et al.* 2009), el análisis del estrés oxidativo en el líquido folicular (Magnusson *et al.* 1986), el consumo de aminoácidos en el medio de cultivo (Brison *et al.* 2004), la evaluación de la actividad metabólica embrionaria (consumo/aparición de glucosa, piruvato y lactato) (Gardner *et al.* 2001; Lopes *et al.* 2007; Scott *et al.*, 2006), el uso de la luz polarizada para visualización del huso y membranas de la zona pelúcida (Montag *et al.*, 2008), el HLA-G como marcador del potencial embrionario

y la cuantificación de los niveles del factor de activación plaquetario (PAF) en el medio de cultivo (Varghese *et al.* 2007).

Nuestro modelo nos permite estimar cuál debería ser el rendimiento diagnóstico de cualquiera de estos tests. Dado que en la transferencia embrionaria única (SET) la morfología, considerando la LR- obtenida en nuestros resultados, nos permite asegurar que un 45% (IC: 39-50%) de los embriones morfológicamente buenos seleccionados son euploides, un nuevo test no invasivo debería tener al menos una LR- de 0.40 para garantizar un incremento significativo en la probabilidad de seleccionar un embrión euploide en SET. Con esta LR- el nuevo test nos permite asegurar que al menos un 57% (IC: 51-63%) de los embriones seleccionados por un resultado normal del nuevo test son euploides.

Hasta ahora, los resultados obtenidos con estos nuevos tests sí alcanzan el rendimiento para SET, como se observa en el estudio de Seli *et al.* (2007). En este estudio se analiza el medio de cultivo embrionario utilizando "Raman and near-infrared spectroscopy". Estos autores obtuvieron una sensibilidad del 86% y una especificidad del 76.5% mediante "Raman spectroscopy", resultando un valor de LR- de 0.22. Y "Near-infrared spectroscopy" proporcionaba una sensibilidad del 75% y una especificidad del 83.3%, resultando un valor de LR- de 0.27.

Sin embargo, estas LR- están alejadas del rendimiento necesario (LR-: 0.06) cuando el nuevo test queremos utilizarlo en transferencia de dos embriones y que supere la probabilidad de transferir al menos un embrión euploide mediante morfología embrionaria. Dado que la LR- exigida al nuevo test es muy baja, creemos que los nuevos tests de selección embrionaria tendrán verdadera validez clínica en el contexto de

SET, pues en transferencias de 2 embriones o más difícilmente tendrán más validez clínica que la morfología embrionaria.

Con la tecnología actual y teniendo en cuenta el número de embriones a transferir, la validez clínica del PGS-FISH aunque es superior a los criterios morfológicos no parece ser clínicamente relevante. Además, los nuevos tests de selección embrionaria deberían ser considerados experimentales hasta que su utilidad quede mejor definida, y sólo deben ser aplicados bajo condiciones de estudio y con los apropiados consentimientos.

Conclusiones

1. La revisión sistemática llevada a cabo sobre esterilidad por factor masculino se caracteriza por la considerable heterogeneidad de los estudios encontrados. En estos estudios existen grandes discrepancias en la definición de esterilidad por factor masculino. Por ello creemos necesario estandarizar la definición de dicha entidad.
2. En la actualidad no existen evidencias científicas para recomendar el uso del SCSA en el diagnóstico de la esterilidad por factor masculino.
3. Para comprobar la validez clínica de los métodos de selección embrionaria es necesario tener en cuenta el número de embriones a transferir. La mayor validez clínica del PGS-FISH en la selección embrionaria respecto a la morfología embrionaria desaparece al aumentar el número de embriones a transferir.
4. Los nuevos tests de selección embrionaria (entre los que se encuentra el PGS-FISH) tendrán verdadera validez clínica en el contexto de SET, pues en transferencias de 2 embriones o más difícilmente tendrán más validez clínica que la morfología embrionaria.
5. Creemos necesaria la realización de estudios aleatorizados sobre nuevos tests de diagnóstico de esterilidad masculina y de selección embrionaria. Estos estudios deben ser diseñados según las recomendaciones internacionales (ej, STARD), deben contemplar comparaciones directas con los métodos diagnósticos empleados habitualmente. Además, se deben evaluar los nuevos tests atendiendo a los criterios de “Medicina Basada en la Evidencia” antes de incorporarlos a la práctica diaria.

Bibliografía

- Agarwal A and Allamaneni SS 2004 The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol.* 2004; 56(3): 235-45.
- Aguilar J, Alvarez C, Morancho-Zaragoza J, Prats-Gimenez R, Ramírez JP, Fernández-Pardo E, et al. Quality specifications for seminal parameters based on clinicians' opinions. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008; 68 (1): 68-76.
- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122 (4): 497-506.
- Alikani M, Calderón G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod.* 2000; 15 (12): 2634-43.
- Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi J, Mack C, Scott R. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril.* 1999; 71(5): 836-42.
- Alikani M, Cohen J. Patterns of cell fragmentation in the human embryo. *J Assist Reprod Genet.* 1995; 12(1): 28s.
- Álvarez C, Castilla JA, Martínez L, Ramírez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation in seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod.* 2003; 18 (10) 2082-8.
- Ammer H, Hehschen A, Lee CH. Isolation and amino acid analysis of human sperm protamines P1 and P2. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1986; 367(6): 515-22.

- Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, Bhattacharya S, Felberbaum R, de Mouzon J, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2008; 23 (4): 756-71.
- Antczak M, Van Blerkom. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod.* 1999; 14(2): 429-47.
- Aragónés M, Herrero R, Cabañes I, Mifsud A, de Pablo JL, Mínguez Y. Biopsia Embrionaria. En: Remohí J. Manual práctico de reproducción humana. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España, 2004. p. 483-91.
- Ardoy M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa MJ, Herrero R, Moreno JM et al. En: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). Cuadernos de embriología clínica. II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Madrid; 2008.
- Baart E.B, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, et al. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2006; 21 (1): 223-33.
- Baart EB, Van Opstal D, Los FJ, Fauser BC, Martini E. Fluorescence in situ hybridization analysis of two blastomeres from day 3 frozen-

- thawed embryos followed by analysis of the remaining embryo on day 5. *Hum Reprod.* 2004; 19 (3): 685-93.
- Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006; 12 (5): 608-15.
- Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Reprod.* 1997; 12 (4): 800-4.
- Balash J, Creus M, Fabregues F, Civico S, Carmona F, Martorell J, Vanrell JA. In-vitro fertilization treatment for unexplained recurrent abortion: a pilot study. *Hum Reprod.* 1996; 11 (7): 1579-82.
- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Stanker LH, Wyrobek A. High-performance liquid chromatographic separation and partial characterization of human protamines 1, 2 and 3. *Biotechnol Appl Biochem.* 1987; 9 (1): 82-8.
- Baltaci V, Satiroglu H, Kabukçu C, Unsal E, Aydinuraz B, Uner O, et al. Relationship between embryo quality and aneuploidies. *Reprod Biomed Online.* 2006; 12 (1): 77-82.
- Ballescá JL, Balash J, Calafell JM, Alvarez R, Fabregues F, De Osaba MJ, et al. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2000; 15 (8): 1734-8.
- Barratt CL, Aitken RJ, Björndahl L, Carrell DT, de Boer P, Kvist U, et al. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic

- science to clinical applications--a position report. *Hum Reprod.* 2010; 25 (4): 824-38.
- Bassas L. Exploración de la función testicular. *Endocrinol Nutr* 2009; 56 (1): 18-31.
- Bielanska M, Jin S, Bernier M, Tan SL, Ao A. Diploid-aneuploid mosaicism in human embryos cultured to the blastocyst stage. *Fertil Steril.* 2005; 84 (2): 336-42.
- Biggerstaff BJ. Comparing diagnostic tests: a simple graphic using likelihood ratios. *Stat Med.* 2000; 19 (5): 649-63.
- Björndahl L, Mortimer D, Barratt C, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U et al. *A Practical guide to Basic Laboratory Andrology.* Cambridge (UK): University Press; 2010.
- Björndahl L, Kjellberg S, Roomans GM, Kvist U. The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation. *Scanning Microsc.* 1987; 1 (3): 1241-7.
- Björndahl L. On sperm nuclear zinc and chromatin decondensation 1986
- Bloekel C, Schutyser V, De Vos A, Verpoest W, De Vos M, Staessen C, et al. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17 (6): 848-54.
- Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, et al. Relation between semen quality and fertility : a population-based

-
- study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*. 1998; 352 (9135): 1172-7.
- Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Ann Intern Med*. 2003; 138 (1): 1-12.
- Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clin Chem*. 2003; 49 (1): 7-17.
- Bossuyt PM, Lijmer JG, Mol BW. Randomised comparisons of medical tests: sometimes invalid, not always efficient. *Lancet*. 2000; 356 (9244) 1844-7.
- Branigan EF, Estes MA, Muller CH. Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. *Fertil Steril*. 1999; 71 (3): 547-551.
- Peter R, Brinsden PR. A textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction. 2nd rev ed. Nueva York: Parteneon Publishing Group. 1999; p. n°.
- Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Verveld M. IVF Lab. Laboratory Aspects of In Vitro Fertilization. Amsterdam: Organon, 1996; p. n°.

Brison DR, Hollywood K, Arnesen R, Goodacre R. Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reprod Biomed Online*. 2007; 15 (3): 296-302.

Brison DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod*. 2004; 19 (10): 2319-24.

Brown MD, Reeves MJ. Evidence-based emergency medicine/skills for evidence-based emergency care. Interval likelihood ratios: another advantage for the evidence-based diagnostician. *Ann Emerg Med*. 2003; 42 (2): 292-7.

Bukulmez O, Arici A. Assessment of ovarian reserve. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16 (3): 231-7.

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.

Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod*. 2004; 19 (6): 1401-8.

Caglar GS, Asimakopoulos B, Nikolettos N, Diedrich K, Al-Hasani S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in

- repeated implantation failure. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10 (3): 381-88.
- Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, D'Agata R. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod*. 2001; 16(6): 1172-9.
- Castilla JA, Alvarez C, Aguilar J, González-Varea C, Gonzalvo MC, Martínez L. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Hum Reprod*. 2006; 21 (4): 847-51.
- Castilla JA, Morancho-Zaragoza J, Aguilar J, Prats-Gimenez R, Gonzalvo MC, Fernández-Pardo E, et al. Quality specifications for seminal parameters based on the state of the art. *Hum Reprod*. 2005; 20 (9): 2573-8.
- Castilla JA, Magán R. Seguridad Biológica en laboratorio de Reproducción Asistida. *Aula de Formación en Embriología Clínica*. Nº 4. Albolote (Granada): Gráficas Fernando; 2003.
- Check JH. Sperm may be associated with subfertility independent of oocyte fertilization. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2005; 32 (1): 5-8.
- Chia SE, Tay SK, Lim ST. What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile men. *Hum Reprod*. 1998; 13 (12): 3394-8.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*. 2006; 27 (1): 53-9.

- Claman P, Armant DR, Seibel MM, Wang TA, Oskowitz SP, Taymor ML. The impact of embryo quality and quantity on implantation and the establishment of viable pregnancies. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1987; 4 (4): 218-22.
- Clavero A, Gonzalvo Mc, Castilla JA. Aula de Formación en Embriología Clínica nº 7. Reflexiones sobre evaluación de donantes de gametos y embriones. Albolote (Granada): Gráficas Fernando; 2007.
- Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod.* 1997; 12 (2): 387-9.
- Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007; 33 (5) 603-21.
- Cohen J, Grifo J.A. Multicentre trial of preimplantation genetic screening reported in the New England Journal of Medicine: an in-depth look at the findings. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15 (4): 365-6.
- Cohen J, Wells D., Munné S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril.* 2007; 87 (3): 496-503.
- Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril.* 2008; 89 (4): 823-31.

- Collins JA, Burrows EA, Willan AR. The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil Steril*. 1995; 64 (1): 22-8.
- Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munné S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil Steril*. 2007; 88 (1): 53-61.
- Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC, van Wissen LC, Bras M, Janssen M, et al. Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Human Reprod*. 2004; 19 (2): 316-24.
- Cooper TG, Keck C, Oberdieck U, Nieschlag E. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Hum Reprod*. 1993; 8 (8): 1251-8.
- Coppus SF, van der Veen F, Bossuyt PM, Mol BW. Quality of reporting of test accuracy studies in reproductive medicine: impact of the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) initiative. *Fertil Steril*. 2006; 86 (5): 1321-9.
- Correa-Pérez JR, Fernández-Pelegri R, Aslanis P, Zavos PM. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necropermia. *Fertil Steril*. 2004; 81 (4): 1148-50.
- Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison

with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1986; 3 (5): 284-95.

Daphnis DD, Fragouli E, Economou K, Jerkovic S, Craft IL, Delhanty JD, et al. Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH. *Mol Hum Reprod.* 2008; 14 (2): 117-25.

De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; 6 (2): 245-50.

Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, et al. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2010; 93 (2): 364-73.

De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril.* 2004; 82 (1): 57-65.

De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum Reprod.* 1998; 13 (1): 1-8.

De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, et al. High outcome predictability alter IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod.* 2002; 17 (9): 2402-9.

Derhaag JG, Coonen E, Bras M, Bergers Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen R, Geraedts JP, et al. Chromosomally abnormal cells are not selected for the extra-embryonic compartment of the human

- preimplantation embryo at the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2003; 18 (12): 2565-74.
- Dersimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials.* 1986; 7 (3): 177–88.
- De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11 (3): 595-97.
- DeUgarte CM, Li M, Surrey M, Danzer H, Hill D, DeCherney AH. Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril.* 2008; 90 (4): 1049-54.
- Donoso P, Devroey P. PGD for aneuploidy screening: an expensive hoax? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007; 21 (1): 157-68.
- Donoso P, Staessen C, Fauser BC, Devroey P. Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF. *Hum Reprod Update.* 2007; 13 (1): 15-25.
- Dinnes J, Deeks J, Kirby J, Roderick P. A methodological review of how heterogeneity has been examined in systematic reviews of diagnostic test accuracy. *Health Technol Assess.* 2005; 9 (12): 1-113.
- Donoso P, Platteau P, Papanikolaou EG, Staessen C, Van Steirteghem A, Devroey P. Does PGD for aneuploidy screening change the selection of embryos derived from testicular sperm extraction in

obstructive and non-obstructive azoospermic men? Hum Reprod. 2006; 21 (9): 2390-5.

Dreesen J, Drüsedau M, Smeets H, de Die-Smulders C, Coonen E, Dumoulin J, et al. Validation of preimplantation genetic diagnosis by PCR analysis: genotype comparison of the blastomere and corresponding embryo, implications for clinical practice. Mol Hum Reprod. 2008; 14 (10): 573-9.

Dujardin B, Van den Ende J, Van Gompel A, Unger JP, Van der Stuyft P. Likelihood ratios: A real improvement for clinical decision making? Eur J Epidemiol. 1994; 10 (1): 29-36.

Edwards RG, Brody SA. Principles and practice of assisted human reproduction. Philadelphia (USA): W.B. Saunders Company Published; 1995.

Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with direct preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. Am J Hum Genet 1990; 47 (4); 656-63.

Ellis NJ, Saboda K, O'Connor J, Nasca PC, Staner EJ, Boyle C. A prospective study of early pregnancy loss. Hum Reprod. 1996; 11 (2): 406-12.

Engh E, Clausen OP, Scholberg A, Tollefsrud A, Purvis K. Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by sperm DNA fluorescence using flow cytometry. Int J Androl. 1992; 15 (5): 407-15.

- Erenpreiss J, Elzanaty S, Giwercman A. Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl.* 2008; 10 (5): 786-90.
- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl.* 2006; 8 (1): 11-29.
- ESHRE Capri Workshop Group. Intrauterine insemination. *Hum Reprod Update.* 2009; 15 (3): 265-77.
- Evenson DP, Wixon R. Data analysis if two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril.* 2008; 90 (4): 1229-31.
- Evenson DP, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online.* 2006; 12 (4): 466-72.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999; 14 (4): 1039-49.
- Fagan T.J. Nomogram for Bayes theorem. *N Engl J Med.* 1975; 293 (5): 257.
- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14 (6): 734-45.

Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2003; 24 (1): 59-66.

Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, de la Torre J. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res.* 2000; 453 (1): 77-82.

Fundació Puigvert, Servicio de Andrología. Infertilidad Masculina y de la Pareja. Disfunción Eréctil y salud sexual en general. Manual de Protocolos; Barcelona; 2009. p. 36-71.

Galán A, Campos P, Blanco C, Salinas R, Pérez S, Cobo A. Inseminación de los ovocitos. En: Remohí J. Manual práctico de reproducción humana. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España, 2004. p. 358-61.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril.* 2001; 76 (6): 1175-80.

Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? Garelo C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, Hartshorne GM. *Hum Reprod.* 1999; 14 (10): 2588-95.

Garrisi JG, Colls P, Ferry KM, Zheng X, Garrisi MG, Munné S. Effect of infertility, maternal age, and number of previous miscarriages on

- the outcome of preimplantation genetic diagnosis for idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2009; 92 (1): 288-95.
- Gart JJ, Zweifl JR. On the bias of various estimators of the logit and its variance with applications to quantal bioassay. *Biometrika*. 1967; 54 (1): 181-7.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trengia V, Farfalli V, et al. The beneficial effects of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy support extensive clinical application. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10 (5): 633-40.
- Gianaroli L, Magli MC, Munné S, Fiorentino A, Montanaro N, Ferraretti AP. Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? *Hum Reprod*. 1997; 12 (8): 1762-7.
- Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Human Reprod*. 1995; 10 (9): 2427-31.
- Glazener CM, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Hinton RA, Kelly NJ, et al. The value of artificial insemination with husband's semen in infertility due to failure of postcoital sperm-mucus penetration--controlled trial of treatment. *Br J Obstet Gynaecol*. 1987; 94 (7): 774-8.
- Gleicher N, Weghofer A, Barad D. Preimplantation genetic screening: "established" and ready for prime time? *Fertil Steril*. 2008; 89 (4): 780-8.

González F, González AL, Martínez M, Fontes J, Martínez FL, Moliní JL et al. Esterilidad General I. En: Matorras R, Hernandez J. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción. Madrid: Adalia; 2007. p. 3-72.

González NL. Toxoplasmosis. Documento de Consenso de la SEGO. Madrid: MEDITEX; 2001.

Gonzalez-Merino E, Emiliani S, Vassart G, Van den Bergh M, Vannin AS, Abramowicz M, et al. Incidence of chromosomal mosaicism in human embryos at different developmental stages analyzed by fluorescence in situ hybridization. Genet Test. 2003; 7 (2): 85-95.

Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC. ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. Hum Reprod. 2009; 24 (8): 1786-810.

Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W, et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. Hum Reprod. 2008; 23 (3): 481-92.

Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Apoptosis of S-phase HL-60 cells induced by DNA topoisomerase inhibitors: detection of DNA

- strand breaks by flow cytometry using the in situ nick translation assay. *Toxicol Lett.* 1993; 67 (1-3): 249-58.
- Greenhalgh T. How to read a paper. Papers that report diagnostic or screening tests. *BMJ.* 1997; 315 (7107): 540-3.
- Greenland S. Quantitative methods in the review of epidemiologic literature. *Epidemiol Rev.* 1987; 9: 1-30.
- Grimes DA, Schulz KF. Refining clinical diagnosis with likelihood ratios. *Lancet.* 2005; 365 (9469): 1500-5.
- Gusse M, Sautiere P, Belaiche D, Martinage A, Roux C, Dadoune JO, et al. Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 884(1): 124-34.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med.* 2001; 345 (19): 1388-93.
- Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, et al. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril.* 1998; 70 (2): 207-13.
- Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, et al. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2008; 23 (12): 2806-12.

Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod.* 2001; 16 (2): 313-8.

Harper J, Sermon K, Geraedts J, Vesela K, Harton G, Thornhill A, et al. What next for preimplantation genetic screening? *Hum Reprod.* 2008; 23 (3): 478-80.

Haugen TB, Egeland T, Magnus O. Semen parameters in Norwegian fertile men. *J Androl.* 2006; 27 (1): 66-71.

Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17 (6): 841-7.

Higgins J.P., Thompson S.G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Statistics in Medicine.* 2001; 21 (11): 1539-58.

Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert CM, Osteen KG, et al. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 1989; 52 (5): 801-6.

Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod.* 2004; 19 (2): 288-93.

- Holte J, Berglund L, Milton K, Garello C, Gennarelli G, Revelli A, et al. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Hum Reprod.* 2007; 22 (2): 548-57.
- Honig SC, Lipshultz LI, Jarro. Significant medical pathology uncovered by comprehensive male infertility evaluation. *Fertil Steril.* 1994; 62 (5): 1028-34.
- Horvath AR, Pewsner D. Systematic reviews in laboratory medicine: principles, processes and practical considerations. *Clin Chim Acta.* 2004; 342 (1-2): 23-9.
- Hu DG, Webb G, Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10 (4): 283-9.
- Huret JL. Variability of the chromatin decondensation ability test on the human sperm. *Arch Androl.* 1983; 11 (1): 1-7.
- Institute for Clinical Systems Improvement (ICSI). Diagnosis and management of basic infertility. Bloomington (MN): Institute for Clinical Systems Improvement (ICSI); 2004 . 47 p.
- Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Hoshino T, Baba K, Matsushita T. Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod.* 2006; 21 (3): 760-5.
- Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an

accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 1998; 70 (1): 60-66.

Jacobson TZ, Barlow DH, Koninckx PR, Olive D, Farquhar C. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; (4): CD001398.

Jaescheke R, Guyatt G, Lijmer J. Diagnostic tests. En: Guyatt G, Rennie D. *Users' guides to medical literature: A Manual for Evidence-Based Clinical Practice*. AMA Press, Chicago; 2002. p.121-40.

James AN, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod*. 2006; 21 (6): 1599-604.

Jansen RP, Bowman MC, de Boer KA, Leigh DA, Lieberman DB, McArthur SJ. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy. *Hum Reprod*. 2008; 23 (7): 1476-8.

Jarrow J, Sigman M. Office evaluation of the subfertile male. *J Urol*. 1994; 152 (6 Pt 1): 2017-9.

Jeyendran RS, Zaneveld LJ. Controversies in the development and validation of new sperm assay. *Fertil Steril*. 1993; 59 (4): 726-8.

Jialiang L., Fine J.P., Safdar N. Prevalence-dependent diagnostic accuracy measures. *Stat Med*. 2007; 26 (17); 3258-73.

Kahraman S, Sertyel S, Findikli N, Kumtepe Y, Oncu N, Melil S, et al. Effect of PGD on implantation and ongoing pregnancy rates in

- cases with predominantly macrocephalic spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2004; 9 (1): 79–85.
- Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000a; 15 (11): 2390-3.
- Kahraman S, Bahçe M, Samli H, Imirzalıoğlu N, Yakışın K, Cengiz G et al. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod*. 2000b; 15 (9): 2003-7.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*.1992; 258 (5083): 818-21.
- Karabinus DS, Gelety TJ. The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertil Steril*. 1997; 67 (3): 536-41.
- Kasinsky HE. Histones and Other Basic Nuclear Proteins. En: Hnilika L, Stein, G, Stein J. Boca Raton, CRC Press, 1989: 73-163.
- Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15 (5): 271-7.

- Kearns WG, Pen R, Graham J, Han T, Carter J, Moyer M et al. Preimplantation genetic diagnosis and screening. *Semin Reprod Med.* 2005; 23 (4): 336-47.
- Keskintepe L., Sher G., Keskintepe M. Reproductive oocyte/embryo genetic analysis: comparison between fluorescence in-situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15 (2): 303-9.
- Knotternus J.A., Van Weel C. General introduction: evaluation of diagnostic procedures. En: Knottnerus JA. *The Evidence Base of Clinical Diagnosis.* London: BMA Books; 2002. p. 1–16.
- Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl.* 1992; 13 (4): 342-8.
- Kuliev A., Verlinsky Y. Impact of preimplantation genetic diagnosis for chromosomal disorders on reproductive outcome. *Reprod Biomed Online.* 2008; 16 (1): 9-10.
- Kvist U, Björndahl L. *ESHRE Monographs: Manual on Basic Semen Analysis.* Oxford (UK): Oxford University Press; 2002.
- Kvist U, Kjellberg S, Björndahl, Hammar M, Roomans GM. Zinc in sperm chromatin and chromatin stability in fertility men and men in barren unions. *Scand J Urol Nephrol.* 1988; 22 (1): 1-6.
- Kvist U, Björndahl L, Kjellberg. Sperm nuclear zinc, chromatin stability, and male fertility. *Scanning Microsc.* 1987; 1 (3): 1241-7.

- Kvist U, Björndahl L. Zinc preserves an inherent capacity for human sperm chromatin decondensation. *Acta Physiol Scand.* 1985; 124 (2): 195-200.
- Kvist U. Rapid post-eyaculatory inhibitory effect of seminal plasma on sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. *Acta Physiol Scand.* 1980; 109 (1): 69-72.
- Lefièvre L, Bedu-Addo K, Conner SJ, Machado-Oliveira GS, Chen Y, Kirkman-Brown JC. Counting sperm does not add up any more: time for a new equation? *Reproduction.* 2007; 133 (4): 675-84.
- Lewis SEM. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction.* 2007; 134 (1): 31-40.
- Lindheim SR, Barad DH, Zinger M, Witt B, Amin H, Cohen B, et al. Abnormal sperm morphology is highly predictive of an intrauterine insemination pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genet.* 1996; 13 (7): 569-72.
- Lopes A.S., Greve T., Callesen H. Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology.* 2007; 67 (1): 21-31.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998; 13 (4): 896-900.
- Los F.J., Van Opstal D., Van den Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Hum Reprod Update.* 2004; 10 (1): 79-94.

Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinou S, Michalakis S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 72: 240-244.

Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril*. 2007; 87 (3): 534-41.

Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod*. 2000; 15 (8): 1781-6.

Magnusson C, Hillensjö T, Hamberger L, Nilsson L. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Hum Reprod*. 1986; 1 (3): 183-4.

Magyar DM, Boyers SP, Marshall JR, Abraham GE. Regular menstrual cycles and premenstrual mood as indicators of ovulation. *Obstet Gynecol*. 1979; 53: 411-14.

Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on optimal evaluation of the infertile male. *Fertil Steril*. 2006; 86 (5 Suppl 1): 202-9.

Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, *et al*. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human

- spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. Biol Reprod. 1995; 52 (4): 864-7.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. N Engl J Med. 2007; 357 (1): 9-17.
- Matorras R, Hernández J. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción. Madrid: Adalia; 2007.
- Matorras R, Corcóstegui B, Perez C, Mandiola M, Mendoza R, Rodríguez-Escudero FJ. Sperm morphology analysis (strict criteria) in male infertility is not a prognostic factor in intrauterine insemination with husband's sperm. Fertil Steril. 1995; 63 (3) 608-611.
- Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standarization of in-vivo thresholds. Hum Reprod. 2001; 16 (6): 1165-71.
- Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M, Casper RF. Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. Hum Reprod. 2001; 16 (10): 2118-23.

- Mersereau JE, Pergament E, Zhang X, Milad MP. Preimplantation genetic screening to improve in vitro fertilization pregnancy rates: a prospective randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2008; 90 (4): 1287-9.
- Merviel P, Heraud MH, Grenier N, Lourdel E, Sanguinet P, Copin H. Predictive factors for pregnancy after intrauterine inseminations (IUI): An analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril*. 2010; 93 (1): 79-88.
- Meyer LR, Klipstein S, Hazlett WD, Nasta T, Mangan P, Karande VC. A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the "good prognosis" patient. *Fertil Steril*. 2009; 91 (5): 1731-8.
- Michiels A, Van Assche E, Liebaers I, Van Steirteghem A, Staessen C. The analysis of one or two blastomeres for PGD using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod*. 2006; 21 (9): 2396-402.
- Misro MM, Chaki SP. Development of a rapid, sensitive, and reproducible laboratory test kit for the assessment of plasma membrane integrity of human sperm. *Fertil Steril*. 2008; 89 (1): 223-7.
- Moayeri SE, Allen RB, Brewster WR, Kim MH, Porto M, Werlin LB. Day-3 embryo morphology predicts euploidy among older subjects. *Fertil Steril*. 2008; 89 (1): 118-23.
- Mol BW, Verhagen TE, Hendriks DJ, Collins JA, Coomarasamy A, Opmeer BC, et al. Value of ovarian reserve testing before IVF: a clinical decision analysis. *Hum Reprod*. 2006; 21 (7):1816-23.

- Molina J, Castilla JA, Castaño JL, Fontes J, Mendoza N, Martinez L. Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients and relationship to seminal parameters. *Hum Reprod.* 2001; 16 (3): 534-9.
- Molina J, Castilla JA, Gil T, Hortas ML, Vergara F, Herruzo A. Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Hum Reprod.* 1995; 10 (5): 1280-6.
- Montag M, Schimming T, Köster M, Zhou C, Dorn C, Rösing B, van der Ven H, et al. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. *Reprod Biomed Online.* 2008; 16 (2): 239-244.
- Montanaro Gauci M, Kruger TF, Coetzee K, Smith K, Van Der Merwe JP, Lombard CJ. Stepwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme. *Andrologia.* 2001; 33 (3): 135-41.
- Moons KG, Grobbee DE. Diagnostic studies as multivariable, prediction research. *J Epidemiol Community Health.* 2002; 56 (5): 337-8.
- Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril.* 1991; 56 (2): 192-3.
- Munné S, Gianaroli L, Tur-Kaspa I, Magli C, Sandalinas M, Grifo J, et al. Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success. *Fertil Steril.* 2007; 88 (4): 781-4.

- Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14 (5): 628-34.
- Munné S, Ary J, Zouves C, Escudero T, Barnes F, Cinioglu C, et al. Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomed Online*. 2006; 12 (3): 340-6.
- Munné S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2005; 84 (2): 331-5.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online*. 2002; 4 (3): 223-32.
- Munné S, Magli C, Bahçe M, Fung J, Legator M, Morrison L, et al. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn*. 1998; 18 (13):1459-66.
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril*. 1995; 64 (2): 382-91.
- Munné S, Estop AM. Chromosome analysis of human spermatozoa stored in vitro. *Hum Reprod*. 1993 Apr;8(4):581-6.

Nagy Z.P., Chang C.C. Current advances in artificial gametes. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11 (3): 332-9.

Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril*. 2006; 85 (3): 629-34.

National Institute for Health and Clinical Excellence. Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. NICE 2004.

Nicolás M, Ballesteros A, Landeras J, Fernández L, Villaquirán AM, Mollá M et al. Inseminación Artificial. En: José Remohí. Manual práctico de reproducción humana. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España, 2004. p. 142-156.

Nieschlag E, Behre HM. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Heidelberg: Springer; 1997.

Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Norman-Taylor JQ, Ramsay JW. Sperm DNA fragmentation in subfertile men: the effect on the outcome of intracytoplasmic sperm injection and correlation with sperm variables. *BJU Int*. 2008; 101 (12); 1553-60.

Niederberger C. Responses to semen analysis CART report. *J Androl*. 2003; 24 (3): 329-31.

Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril*. 2000; 73 (2): 300-4.

- Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1991; 40: 25-94.
- Ombelet W, Wouters E, Boels L, Cox A, Janssen M, Spiessens C, et al. Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and a subfertile population. *Int J Andro.* 1997a; 20 (6): 367-72.
- Ombelet W, Vandeput H, Van de Putte G, Cox A, Janssen M, Jacobs P et al., Intrauterine insemination after ovarian stimulation with clomiphene citrate: predictive potential of inseminating motile count and sperm morphology. *Hum Reprod.* 1997b; 12 (7): 1458-63.
- Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, Cox A, Jacobs P, Janssen M et al. Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod BioMed Online.* 2003; 7 (4): 485-92.
- Opsahl MS, Miller B, Klein TA. The predictive value of hysterosalpingography for tubal and peritoneal infertility factors. *Fertil Steril.* 1993; 60 (3): 444-8.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997; 12 (3): 532-41.
- Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simón C, et al. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online.* 2003; 6 (2): 232-7.

- Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998; 13 (4): 960-3.
- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Mínguez Y, Giménez C, Egozcue J, et al. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril.* 1999; 71 (6): 1033-9.
- Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years. *Fertil Steril.* 2005a; 84 (2): 319–24.
- Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in patients with unexplained recurrent miscarriages. *Fertil Steril.* 2005b; 83 (2): 393–7.
- Platteau P, Staessen C, Michiels A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I, et al. Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and nonobstructive azoospermic men. *Hum Reprod.* 2004; 19 (7): 1570–4.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil and Steril.* 2006; 86: 35–7.

Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. *Fertil Steril*. 2007; 88 (6): 1497-504.

Preimplantation genetic testing: a Practice Committee Opinion. *Fertil Steril*. 2007; 88 (6): 1497-504.

Polansky FF, Lamb EJ. Do the results of semen analysis predict future fertility? A survival analysis study. *Fertil Steril*. 1988; 49 (6): 1059-65.

Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod*. 1987; 2 (8): 705-8.

Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, et al. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online*. 2003; 6 (3): 323-31.

Rantala ML. Causes and outcome of infertility in previously unexamined couples. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1988; 67 (5): 429-32.

Remohi J, Romero JL, Pellicer A, Simón C y Navarro J. Manual práctico de reproducción humana. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España, 2004.

- Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril* 2001; 76 (6): 1157-67.
- Rijnders PM, Jansen CA. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998; 13 (10): 2869-73.
- Roldan-Nofuentes JA, Luna del Castillo JD. Comparison of the likelihood ratios of two binary diagnostic tests in paired designs. *Stat Med*. 2007; 26 (22): 4179-201.
- Royère D. Intrauterine insemination in human: state-of-the-art. *Gynecol Obstet Fertil*. 2004; 32 (10): 873-9.
- Roux C, Borodkine R, Joanne C, Bresson JL, Agnani G. Morphological classification of human in-vitro fertilization embryos based on the regularity of the asynchronous division process. *Hum Reprod Update*. 1995; 1 (5): 488-96.
- Ruangvutilert P, Delhanty JD, Serhal P, Simopoulou M, Rodeck CH, Harper JC. FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. *Prenat Diagn*. 2000; 20 (7): 552-60.
- Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Pehlivan T, et al. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat Diagn*. 2007; 27 (8): 748-56.

- Rubio C, Rodrigo L, Pérez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendía P, et al. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11 (4): 497–506.
- Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod*. 2003; 18 (1): 182-8.
- Sadowy S, Tomkin G, Munné S, Ferrara-Congedo T, Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote*. 1998; 6 (2): 137-41.
- Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod*. 2001; 16 (9): 1954-8.
- Sackett D.L., Haynes, R.B., Guyatt, G.H. et al. *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*. Williams and Wilkins, Boston, 51–69.
- Sackett DL, Deeks JJ, Altman DG. Down with odds ratios! *Evid Based Med*. 1996; 1: 164-6.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999; 4 (1): 31-7.
- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to

- seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Ferti Steril.* 2003; 79: 1597-1605
- 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. *Ferti Steril.* 2002; 78 (2): 313-8.
- Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001; 16 (10): 2177-81.
- Sarrate Z, Anton EJ. Fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm. *Vis Exp* 2009; 1 (31): 1405.
- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril.* 2009; 92 (1): 157-62.
- Scott L, Berntsen J, Davies D, Gundersen J, Hill J, Ramsing N. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Human oocyte respiration-rate measurement--potential to improve oocyte and embryo selection? *Reprod Biomed Online.* 2008; 17 (4): 461-9.
- Scott L. Predicting Embryo Development. En: Rabe T, Dietrich K, Strowitzki T. *Manual on Assisted Reproduction.* Springer; 2000. p. 321-338.

- Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2007; 88 (5): 1350-7.
- Sellés E, Mollá M, Nicolás M, Santa A, Gómez E, Garda AL et al. Capacitación Espermática. En: José Remohí. Manual práctico de reproducción humana. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España, 2004. p. 283-7.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. 2005; 20 (12): 3446-51.
- Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Kadhum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12 (6): 1267-70.
- Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003; 126 (1): 12-25.
- Sher G, Keskindepe L, Keskindepe M, Maassarani G, Tortoriello D, Brody S. Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages. *Fertil Steril*. 2009; 92 (6): 1886-94.
- Shulman A, Ben-Nun I, Ghetler Y, Kaneti H, Shilon M, Beyth Y. Relationship between embryo morphology and implantation rate

- after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril*. 1993; 60 (1): 123-6.
- Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, Kilani Z, Munné S. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2003; 79 (1): 30-8.
- Simón C, Rubio C, Vidal F, Gimenez C, Moreno C, Parrilla JJ, et al. Increased chromosome abnormalities in human preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reprod Fertil Dev*. 1998; 10 (1): 87-92.
- Simpson JL. Genes, chromosomes and reproductive failure. *Fertil Steril*. 1980; 33 (2): 107-16.
- Snick HK, Snick TS, Evers JL, Collins JA. The spontaneous pregnancy prognosis in untreated subfertile couples: the Walcheren primary care study. *Hum Reprod*. 1997; 12 (7): 1582-8.
- Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73 (1): 43-50.
- Spano M, Calugi A, Capuano V, de Vita R, Göhde W, Hacker-Klom U et al. Flow cytometry and sizing for routine andrological analysis. *Andrologia*. 1984; 16 (4): 367-75.
- Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, et al. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod*. 2008; 23 (12): 2818-25.

Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2004; 19 (12): 2849-58.

Staessen C, Camus M, Bollen N, Devroey P, Van Steirteghem AC. The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril.* 1992; 57 (3): 626-30.

Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod.* 1992; 7 (1): 117-9.

Stevens J, Wale P, Surrey ES, Schoolcraft WB. Is aneuploidy screening for patients aged 35 or over beneficial? A prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2004; 82 (2); 249.

Summers MC, Foland AD. Quantitative decision-making in preimplantation genetic (aneuploidy) screening (PGS). *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26 (9-10); 487-502.

Swan SH, Elkin EP. Declining semen quality: can the past inform the present? *Bioessays.* 1999; 21 (7): 614-21.

Tempest HG, Ko E, Rademaker A, Chan P, Robaire B, Martin RH. Intra-individual and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men. *Fertil Steril.* 2009; 91 (1): 185-92.

Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14 (5): 1318-1323.

The ESHRE Capri Workshop. European Society for Human Reproduction and Embryology. . Infertility revisited: the state of the art today and tomorrow. *Hum Reprod*. 1996; 11 (8): 1779-807.

The Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association and the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on optimal evaluation of the infertile male. *Fertil Steril*. 2006; 86 (5 suppl 1): 202-9.

Toner JP, Mossad H, Grow DR, Morshedi M, Swanson RJ, Oehninger S. Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrología*. 1995; 27 (3): 143-8.

Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, et al. ESHRE PGD consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod*. 2005; 20 (1): 35-48.

Trussler JL, Pickering SJ, Ogilvie CM. Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online*. 2004; 8 (6): 701-11.

Twisk M, Mastenbroek S, Hoek A, Heineman MJ, van der Veen F, Bossuyt PM, et al. No beneficial effect of preimplantation genetic screening

- in women of advanced maternal age with a high risk for embryonic aneuploidy. *Hum Reprod.* 2008; 23 (12): 2813-7.
- Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod.* 2000; 15 (12): 2621-2633.
- Van der Steeg JW, Steures P, Hompes PG, Eijkemans MJ, van der Veen F, Mol BW. Investigation of the infertile couple: a basic fertility work-up performed within 12 months of trying to conceive generates costs and complications for no particular benefit. *Hum Reprod.* 2005; 20 (10): 2672-4.
- Van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, Habbema JD, Bossuyt PM, Hompes PG et al. Do clinical prediction models improve concordance of treatment decisions in reproductive medicine? *BJOG.* 2006; 113 (7): 825-31.
- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med.* 2009; 15 (5): 577-83.
- Vanrell JA, Balasch J, Cívico S. Esterilidad de origen desconocido: incidencia y resultados de la fecundación in vitro. *Prog Obst Gin.* 1993; 36: 128-32.
- Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, et al. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod.* 2003; 18 (5): 1062-9.

- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum Reprod.* 2001; 16 (2): 326-32.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod.* 1999;14 (9): 2345-9.
- Van Voorhis BJ, Barnett M, Sparks AE, Syrop CH, Rosenthal G, Dawson J. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2001; 75 (4): 661-8.
- Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 2001; 7 (5): 495-500.
- Varghese AC, Goldberg E, Bhattacharyya AK, Agarwal A. Emerging technologies for the molecular study of infertility, and potential clinical applications. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15 (4): 451-6.
- Veeck L. Preembyo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group; 1999. p. 46-51.

- Vidal F, Giménez C, Rubio C, Simón C, Pellicer A, Santaló J, et al. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet.* 1998; 15 (5): 310-3.
- Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet.* 2000; 106 (2): 210-7.
- Warburton D, Stein Z, Kline J, Susser M. Chromosome abnormalities in spontaneous abortions : data from the New York City study. In: Porter LH, Hook EB. *Human embryonic and fetal death.* New York: Academic Press; 1980. p. 261-7.
- Weidner W, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Pomeroy JM, Ghosh C; EAU Working Group on Male Infertility. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 2002; 42 (4): 313-22.
- Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod.* 2008; 14 (12): 703-10.
- Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6 (11): 1055-62.
- Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Marello E, Hill D, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril.* 2003; 80 (2): 467-8.

- Wiegerinck MA, Bongers MY, Mol BW, Heineman MJ. How concordant are the estimated rates of natural conception and in-vitro fertilization/embryo transfer success? *Hum Reprod.* 1999; 14 (3): 689-93.
- Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod.* 2009; 24 (5): 1221-8.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril.* 2003; 80 (4): 860-8.
- World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction.* 5th Ed. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 2010.
- World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction.* 4th Ed. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1999.
- Wouts MH, Duisterhout JS, Kuik DJ, Schoemaker J. The chance of spontaneous conception for the infertile couple referred to an academic clinic for reproductive endocrinology and fertility in The Netherlands. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1987; 26 (3): 243-50.
- Ziebe S, Lundin K, Loft A, Bergh C, Nyboe Andersen A, Selleskog U, et al. FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected

- donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. Hum Reprod. 2003; 18 (12): 2575-81.
- Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1997; 12 (7): 1545-9.
- Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. J Androl. 2000; 21 (1): 145-53.
- 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.
- Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. Fertil Steril. 2001; 75 (4): 674-7.
- Zhou XH, Obuchowski NA, McClish DK. Statistical Methods in Diagnostic Medicine. New York: Wiley, 2002.
- Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. Hum Reprod 2002; 17 (5): 1327-33.