

1 **EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO LUEGO DEL EMPLEO**

2 **DIFERENTES TÉCNICAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA**

3 **EVALUATION OF SPERM DNA FRAGMENTATION AFTER USING DIFFERENT SPERM**

4 **SELECTION TECHNIQUES**

5 Cuesta Carolina^{1,2}, Estefanía Martínez¹, Antonio Cattaneo¹, Diego Gnocchi¹, Marcela

6 Irigoyen¹, Lautaro Tessari¹, A. Gustavo Martinez^{1,2}

7

8 ¹ Medicina Reproductiva Fertilis - Boulogne, Buenos Aires, Argentina.

9 ² Universidad de Belgrano – Buenos Aires, Argentina

10

11 Correspondencia: A. Gustavo Martinez

12 agmartinez@fertilis.com.ar

13

14 **-RESUMEN**

15 **Pregunta de estudio:** Qué técnica de selección espermática reducirá en mayor
16 proporción los niveles de fragmentación del ADN espermático?

17 **Respuesta resumida:** El sistema microfluídico ZyMöt logró la mayor reducción de la
18 fragmentación del ADN espermático comparado con Swim-up y Gradiente de
19 densidad.

20 **Lo que ya se sabe:** Altos niveles de fragmentación del ADN espermático pueden
21 afectar el éxito reproductivo en diversas formas: pobre calidad embrionaria,
22 disminución de las tasa de implantación y de embarazo, aumento del tiempo de
23 concepción entre otras.

24 **Diseño del estudio:** Dos experimentos prospectivos, con 25 y 19 pacientes
25 respectivamente, realizado entre enero 2019 y marzo 2021.

26 **Materiales y Métodos:** En el experimento 1 se evaluó la fragmentación del ADN
27 espermático luego del procesamiento de las muestras de semen mediante las técnicas
28 gradiente de densidad y Swim-up. En el experimento 2 se evaluó la fragmentación del
29 ADN espermático luego del procesamiento de las muestras de semen mediante las
30 técnicas Swim-up y del sistema microfluídico ZyMöt. Para evaluar la fragmentación del
31 ADN espermático, se utilizó la técnica de Tunel post procesamiento. Los resultados
32 fueron analizados mediante los test Kruskal-Wallis y Mann Whitney según
33 correspondiera, considerando significativos los valores de $p < 0.05$.

34 **Resultados:**

35 En el Experimento 1, la técnica Swim-up mostró una disminución significativamente
36 mayor de la fragmentación del ADN espermático al compararla con el gradiente de
37 densidad ($9.1\% \pm 1.9$ vs. $19.2\% \pm 5.1$). En el Experimento 2, el sistema microfluídico

38 mostró una disminución significativamente mayor de la fragmentación del ADN
39 espermático al compararlo con el Swim-up ($1.3\% \pm 0.7$ vs. $9.1\% \pm 2.0$).

40 **Implicancias de los hallazgos:** Es necesario evaluar la utilidad de un determinado
41 método de selección espermática de acuerdo a la técnica de reproducción asistida
42 donde la muestra enriquecida va a ser empleada. ZyMöt mostró ser más eficaz para
43 reducir la fragmentación del ADN espermático.

44

45 **Palabras claves:** Fragmentación del ADN espermático, selección espermática,
46 dispositivo microfluídico.

47

48 **ABSTRACT**

49 **Study question:** Which sperm selection technique will most significantly reduce sperm
50 DNA fragmentation levels?

51 **Summary answer:** The ZyMöt microfluidic system achieved the greatest reduction in
52 sperm DNA fragmentation compared to Swim-up and Density Gradient centrifugation.

53 **What is already known:** High levels of sperm DNA fragmentation can affect
54 reproductive success in various ways: poor embryonic quality, decreased implantation
55 and pregnancy rates and increased conception time.

56 **Study design:** Two prospective experiments, with 25 and 19 patients respectively,
57 conducted between January 2019 and March 2021.

58 **Materials and Methods:** Sperm DNA fragmentation was evaluated in Experiment 1
59 after processing semen samples using Density Gradient centrifugation and Swim-up
60 techniques and in Experiment 2 it was evaluated after processing semen samples using
61 Swim-up techniques and the ZyMöt microfluidic system. To evaluate sperm DNA
62 fragmentation post-processing Tunel technique was used. The results were analyzed
63 using the Kruskal-Wallis and Mann Whitney tests as appropriate, considering p values
64 <0.05 significant.

65 **Results:** In Experiment 1, the Swim-up technique showed a significantly greater
66 decrease in sperm DNA fragmentation when compared to Density Gradient
67 centrifugation (9.1% \pm 1.9 vs. 19.2% \pm 5.1). In Experiment 2, the microfluidic system
68 showed a significantly greater decrease in sperm DNA fragmentation when compared
69 to swim-up (1.3% \pm 0.7 vs. 9.1% \pm 2.0).

70 **Wider implications of the findings:** It is necessary to evaluate the usefulness of a
71 certain method of sperm selection according to the assisted reproduction technique

72 where the enriched sample will be used. ZyMöt proved to be more effective in
73 reducing sperm DNA fragmentation.

74

75 **Key words:** Sperm DNA Fragmentation, sperm selection, microfluidic device

76

77 **INTRODUCCIÓN**

78 El material genético paterno compone el 50% del genoma embrionario, y contiene
79 genes involucrados tanto en el correcto desarrollo embrionario y fetal. Los daños
80 producidos en el ADN espermático pueden afectar el éxito reproductivo en diversas
81 formas: pobre calidad embrionaria, disminución de las tasa de implantación y de
82 embarazo, aumento del tiempo de concepción entre otras (1-3). Por ello, el nivel de
83 integridad genómica se asocia a la calidad seminal, de hecho se ha comprobado en una
84 alta proporción de hombres infértiles un aumento de la fragmentación del ADN
85 espermático, determinando a este parámetro seminal en particular como la causa
86 principal de infertilidad masculina a nivel molecular (4). Dicho factor masculino es de
87 origen multicausal, siendo el principal contribuyente el estrés oxidativo, producido por
88 un desbalance entre las especies reactivas a oxígeno y las especies antioxidantes (5,6).
89 Cuando el hombre realiza un tratamiento de fertilidad, una de las causas de estrés
90 oxidativo adicional, está ligada a las técnicas rutinarias de selección espermática:
91 Swim-up o gradiente de densidad, debido a que incluyen pasos de centrifugación que
92 someten al gameto masculino a estrés fisiológico y genera sobreproducción de
93 especies reactivas de oxígeno en ésta (7).
94 Ante estos hallazgos, el enfoque actual en el desarrollo de nuevas técnicas de selección
95 espermática es preservar la integridad del ADN con objetivo de conseguir un recién
96 nacido vivo sano. Entre las técnicas de vanguardia se destacan los dispositivos
97 microfluídicos, los cuales han estado en auge durante la última década por su alta
98 eficiencia (8). Esta novedosa tecnología posee la propiedad de manipular pequeños
99 volúmenes de muestras biológicas a micro escala que, aplicada a la andrología,
100 permite imitar en tres dimensiones el entorno biofísico al que están expuestos los

101 espermatozoides en el proceso de selección *in vivo* (9,10). Los sistemas disponibles se
102 presentan en forma de chips, los cuales están demostrando su capacidad de mejorar
103 de manera efectiva y consistente los parámetros clave de las muestras de semen como
104 el recuento, la motilidad y la morfología espermática, así como también, una mayor
105 integridad del ADN al prescindir de la centrifugación (11,12). Cabe destacar que esta
106 metodología utiliza muestras en fresco y sólo requiere de medio para recuperar la
107 muestra procesada. Todas estas facultades posicionan a los chips microfluídicos como
108 potenciales candidatos a utilizarse en las clínicas de fertilidad.

109 El presente estudio fue realizado como parte de la implementación de una técnica
110 para disminuir la fragmentación del ADN espermático en muestras con altos niveles
111 del mismo. Por ello, el objetivo del mismo fue comparar el efecto de tres técnicas de
112 selección de espermatozoides sobre este parámetro seminal.

113

114 **MATERIALES Y MÉTODOS**

115

116 **Diseño:** Estudio prospectivo llevado a cabo en Medicina Reproductiva Fertilis entre
117 enero de 2019 y marzo de 2021.

118

119 Se emplearon muestras de semen de varones diagnosticados normozoospermicos,
120 según los parámetros estandarizados publicados en el manual de la OMS 2010 (13).
121 Además de los pacientes que no cumplían con este requisito también fueron excluidas
122 las muestras de aquellos pacientes con azoospermia, criptozoospermia, eyaculación
123 retrógrada, leucocitospermia y los que habían sido expuestos a quimioterapia,
124 radioterapia o pesticidas u otros tóxicos y también los pacientes con una historia de
125 infección o fiebre en los 3 meses previos al tratamiento. Las comparaciones se
126 realizaron en dos experimentos.

127

128 **Experimento 1: Comparación de los niveles de fragmentación del ADN espermático**
129 **luego del procesamiento de las muestras de semen mediante gradiente de densidad**
130 **y Swim-up**

131 Se emplearon 25 muestras de semen de pacientes con indicación de espermograma
132 completo y análisis de fragmentación del ADN espermático. Las edades de dichos
133 pacientes osciló entre los 30 y 39 años (edad promedio: 34.3 ± 2.4). Los pacientes
134 firmaron el consentimiento de investigación correspondiente.
135 Luego de registrar los parámetros seminales básicos de la muestra en fresco: volumen,
136 concentración y movilidad, cada muestra fue dividida en dos fracciones tratando cada
137 una ya sea mediante un gradiente de densidad o mediante un Swim-up. Luego de

138 procesadas las muestras se registró el volumen, la concentración y la movilidad, junto
139 con el nivel de fragmentación del ADN espermático. Finalmente se procedió a
140 comparar la fragmentación del ADN luego del procesamiento de las muestras con
141 ambas metodologías.

142

143 **Experimento 2: Comparación de los niveles de fragmentación del ADN espermático**
144 **luego del procesamiento de las muestras de semen mediante Swim-up y un sistema**
145 **microfluídico (ZyMöt)**

146 Se emplearon 19 muestras de semen entregadas para realizar fecundación *in-vitro*
147 obtenidas de pacientes que habían realizado espermogramas previos en los cuales se
148 había determinado niveles de fragmentación del ADN espermático >20% luego del
149 procesamiento por gradiente de densidad. El promedio del nivel de fragmentación
150 espermática fue 25.8 ± 2.6 . Las edades oscilaron entre los 32 y 38 años (edad promedio
151 34.4 ± 1.9). Los pacientes firmaron el consentimiento de investigación correspondiente.
152 Luego de registrar los parámetros seminales básicos de la muestra en fresco: volumen,
153 concentración y movilidad, se tomaron dos fracciones de 0.85 ml de cada muestra, las
154 cuales fueron tratadas ya sea mediante un Swim-up o con un sistema microfluídico
155 (ZyMöt, EEUU). Luego de procesadas las muestras se registró el volumen, la
156 concentración y la movilidad, junto con el nivel de fragmentación del ADN
157 espermático. Finalmente se procedió a comparar la fragmentación del ADN luego del
158 procesamiento de las muestras con ambas metodologías.

159

160 **Técnicas de procesamiento de las muestras de semen**

161 Gradiente de densidad: luego de evaluados el volumen, la concentración y la movilidad
162 de la muestra de semen, esta fue sembrada sobre un gradiente de dos capas de
163 diferente concentración (50% y 90%) de PureCeption (SAGE, EEUU) en un tubo de
164 centrífuga de 15 ml (Nunc, Dinamarca). El sistema fue centrifugado durante 20
165 minutos a 300g. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se
166 resuspendió en medio HTF modificado (SAGE, EEUU) suplementado con 3% de
167 albúmina (SAGE, EEUU). Luego de ello se realizó una nueva centrifugación de 10 min a
168 300g y se descartó el sobrenadante. Finalmente, el precipitado fue diluido en medio
169 HTF modificado suplementado con 3% de albúmina, llevando el volumen final a 0.4 ml.
170 Se evaluó la concentración y la movilidad empleando una cámara de Makler.

171 Técnica de Swim-up: luego de evaluar el volumen, la concentración y la movilidad de la
172 muestra de semen, esta fue colocada en un tubo de centrífuga de 15 ml, colocando
173 sobre ella 2 ml de medio HTF modificado suplementado con 3% de albúmina. Luego de
174 ello, el tubo fue incubado durante una hora a 37°C en un cubo térmico.
175 Posteriormente, se tomó el sobrenadante y se lo depositó en un nuevo tubo de
176 centrífuga de 15 ml, el cual fue centrifugado durante 5 min a 300g. Finalmente, se
177 descartó el sobrenadante y el precipitado fue diluido en medio HTF modificado
178 suplementado con 3% de albúmina, llevando el volumen final a 0.4 ml o 0.85 ml según
179 el experimento. Se evaluó la concentración y la movilidad empleando una cámara de
180 Makler.

181 Técnica de dispositivo microfluídico (ZyMöt): luego de evaluar el volumen, la
182 concentración y la movilidad de la muestra de semen, esta fue colocada en un chip
183 ZyMöt (Figura 1). En primer lugar, se cargaron 0.85 ml de la muestra en fresco en el
184 orificio de carga, llenando de esta forma el compartimento inferior. A continuación, se

185 agregaron 2 ml medio HTF modificado suplementado con 3% de albúmina en el
186 compartimento superior del sistema. El dispositivo fue incubado durante 30 min en
187 cámara húmeda a 37°C, luego de lo cual se recolectaron 0.85 ml de la solución
188 resultante en la cámara superior, los cuales fueron colocados en un tubo de centrifuga
189 de 15 ml. Se evaluó la concentración y la movilidad empleando una cámara de Makler.

190

191 **Evaluación del grado de fragmentación del ADN espermático**

192 Una vez procesadas las muestras por gradiente de densidad, Swim-up o ZyMöt, se
193 tomaron 100 µl de las mismas para fijarlos agregando 5 µl de Formaldehído al 37%
194 para el futuro procesamiento por TUNEL. Dichas muestras fueron colocadas en
195 heladera hasta el momento de uso.

196 Para realizar la técnica de TUNEL, se emplearon portaobjetos con pocillos, los cuales
197 fueron sumergidos por al menos 2 horas en Polilisina 0.1% y enjuagados con agua ultra
198 pura. Luego del secado a temperatura ambiente se retiraron de la heladera las
199 muestras fijadas con Formaldehído al 37% y se sembraron 30 µl de cada una de ellas
200 en sus correspondientes pocillos por duplicado. Los portaobjetos se guardaron dentro
201 de una cámara húmeda conformada por una placa de Petri y papel tissue húmedo en
202 su interior a 37°C por 1 hora. Se dejaron reposar en heladera por 24 horas. Luego de
203 ello, las muestras fueron lavadas tres veces con 10 µl de PBS 1x, cada una durante 5
204 min. Luego se agregó Metanol por 90 segundos y se repitieron los 3 lavados con PBS
205 1x. Se colocaron 10 µl de solución de bloqueo PBS+0.5%BSA dejándola por 50 min
206 dentro de la cámara húmeda en la heladera y una vez concluido ese tiempo, se
207 realizaron otros 3 lavados con PBS 1x. Protegidos de la luz, a cada pocillo se le añadió
208 una mezcla de 4.5 µl de label y 3.5 µl de enzima y los portaobjetos se dejaron dentro

209 de la cámara húmeda por una hora sobre una platina térmica a 37°C. Seguidamente, se
210 realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con 10 µl de PBS 1x y se dejó secar por
211 completo a temperatura ambiente, siempre evitando la exposición a luz. Por último, se
212 agregaron 5 µl de agente de montaje Vecta-Shield a cada pocillo y por encima se
213 colocó un cubreobjetos de 24x50 mm.

214 Finalmente, se observó en el microscopio de fluorescencia a un aumento de 100X bajo
215 aceite de inmersión. En cada ensayo se analizaron 200 espermatozoides. Los
216 espermatozoides que presentaron ADN fragmentado mostraron fluorescencia verde.
217 Se consideró con marcación positiva a aquellos espermatozoides con fluorescencia en
218 al menos el 50% del citoplasma, mientras que el resto de las células fueron
219 consideradas negativas. Se registró el número de espermatozoides por marcación
220 positiva sobre los espermatozoides totales.

221

222 **Análisis estadístico**

223 Los resultados fueron evaluados empleando el Mann Whitney Test en el Experimento
224 1 y el Kruskal-Wallis Test en el Experimento 2, utilizando el programa InStat versión 7
225 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados
226 significativos.

227

228 **RESULTADOS**

229

230 **Experimento 1: Comparación de los niveles de fragmentación del ADN espermático**

231 **luego del procesamiento de las muestras de semen mediante gradiente de densidad**

232 **y Swim-up**

233 En la tabla 1 se detallan los valores promedio de los parámetros seminales de las 25

234 muestras de semen procesadas en el Experimento 1.

235

236 Al comparar los resultados obtenidos luego del procesamiento de la muestra mediante

237 gradiente de densidad y Swim-up se observó que la fracción de la muestra procesada

238 por gradiente de densidad tuvo significativamente una mayor concentración

239 espermática y un mayor número de espermatozoides progresivos totales; mientras

240 que, la fracción procesada por Swim-up mostró significativamente una mayor

241 porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y menor porcentaje de

242 fragmentación del ADN espermático (Tabla 2).

243

244 **Experimento 2: Comparación de los niveles de fragmentación del ADN espermático**

245 **luego del procesamiento de las muestras de semen mediante Swim-up y un sistema**

246 **microfluídico (ZyMöt)**

247 En la tabla 3 se detallan los valores promedio de las 19 muestras de semen procesadas

248 en el Experimento 2.

249

250 Al comparar los resultados obtenidos luego del procesamiento de la muestra mediante

251 Swim-up y ZyMöt, se observó que la fracción de la muestra procesada por Swim-up

252 tuvo significativamente una mayor concentración espermática y un mayor número de
253 espermatozoides progresivos totales; mientras que, la fracción procesada por ZyMöt
254 mostró significativamente un mayor porcentaje de espermatozoides móviles
255 progresivos y menor porcentaje de fragmentación de ADN espermático (Tabla 4).
256

257 DISCUSIÓN

258 Como resultado de la primera parte del presente trabajo hemos encontrado que pese
259 a que, con el gradiente de densidad se obtiene una mayor concentración de
260 espermatozoides y un mayor número de espermatozoides progresivos totales, la
261 fracción de la muestra procesada mediante Swim-up mostró un nivel de fragmentación
262 del ADN espermático significativamente menor. La posible explicación de este hallazgo
263 es la diferencia en el tiempo de centrifugación en cada uno de los métodos de
264 selección. En el gradiente de densidad se realizan dos centrifugaciones, la primera de
265 20 minutos para realizar la selección espermática y la segunda de 10 minutos para
266 lavar la muestra. En contraste, en el Swim-up se realiza una primera selección pasiva
267 basada sólo en la capacidad que poseen los espermatozoides de nadar hacia el medio
268 de cultivo dejando atrás a aquellos que no pueden moverse o se mueven poco, para
269 finalmente realizar la concentración de la muestra obtenida mediante una
270 centrifugación de 5 minutos. Han sido demostrado los efectos que producen los pasos
271 de centrifugación al someter al gameto masculino a un estrés fisiológico y generar
272 sobreproducción de especies reactivas de oxígeno en la muestra procesada (7),
273 trayendo por consiguiente alteraciones seminales, entre ellas, mencionado el daño del
274 ADN espermático.

275 A la luz de estos resultados sería recomendable la elección de la técnica de Swim-up
276 para procesar las muestras de semen para un tratamiento de reproducción asistida.
277 Pese a ello, esta técnica tiene algunas limitaciones tales como la dificultad para
278 procesar muestras con alta viscosidad, o la baja recuperación en las muestras con muy
279 baja densidad de espermatozoides (oligozoospermicas). Teniendo en cuenta lo
280 mencionado, se debe evaluar la conveniencia de usar una u otra técnica dependiendo

281 del uso posterior de la muestra procesada. Mientras que para una inseminación
282 artificial se necesita obtener una gran cantidad de espermatozoides aceptando que el
283 porcentaje de móviles progresivos sea algo menor al 100% (14), para utilizar la
284 muestra en una fecundación *in vitro* convencional será preferible tener un alto
285 porcentaje de espermatozoides móviles progresivos (idealmente el 100%) pese a
286 contar con menor cantidad de espermatozoides totales. El hecho de que con el Swim-
287 up se obtengan muestras con menores niveles de fragmentación del ADN luego de ser
288 procesadas agrega una gran ventaja a este método para ser usado en fecundación *in*
289 *vitro* convencional. En el caso de la inseminación intrauterina es esperable que el
290 aparato reproductor femenino seleccione el espermatozoide óptimo.

291 En la comparación de las técnicas de Swim-up y el sistema microfluídico ZyMöt, ambos
292 mostraron buenos resultados, de modo que, las dos metodologías de selección son
293 aceptables para su utilización en tratamientos de fecundación *in vitro*. Pero en el caso
294 de ZyMöt, este mostró una mayor capacidad de disminución del nivel de
295 fragmentación del ADN espermático (cercano a 0%), lo cual le confiere una ventaja
296 mayor para ser aplicado en tratamientos de fertilización *in vitro*. Este sistema, basado
297 en el Swim-up, no solo evita la centrifugación, también limita el ascenso de
298 determinados espermatozoides por la presencia de una membrana micro porosa. Esta
299 actúa como una barrera que impide el pasaje de espermatozoides con morfología y
300 motilidad alteradas, los cuales se pueden correlacionar con lesiones en su ADN. De allí
301 otra razón por la que este tipo de dispositivo permite recuperar espermatozoides con
302 mayor integridad genómica (15-17).

303 Una limitación del Experimento 2 es el hecho de no saber si el día en que las muestras
304 fueron empleadas para realizar fecundación *in vitro* el porcentaje de espermatozoides

305 con fragmentación del ADN espermático era de igual valor al diagnosticado en el
306 espermograma. Pese a ello, el análisis de los valores de Tunel obtenidos muestran que,
307 cualquiera sea la técnica empleada, los resultados con el uso de ZyMöt son los más
308 aceptables.

309 Es importante destacar que la técnica del sistema microfluídico tiene algunas
310 limitaciones tales como la dificultad en el uso de muestras con alta viscosidad, o
311 muestras con presencia de burbujas, y muestras con oligozoospermia severa.
312 Cabe mencionar también que, al tratarse de un laboratorio nuevo, el mismo no
313 contaba con una herramienta para llevar a cabo el presente estudio, por lo que entre
314 las diferentes opciones, se evaluó adquirir columnas de Anexina-V para su realización.
315 Finalmente esta opción fue descartada debido a su alto costo de implementación, el
316 relativo corto vencimiento de las columnas y el hecho de no contar con datos
317 concluyentes sobre los efectos del campo magnético en los espermatozoides
318 sometidos a este proceso de selección (18).

319 En conclusión, a partir de nuestros resultados podemos afirmar que es necesario
320 evaluar la utilidad de un determinado método de selección espermática de acuerdo a
321 la técnica de reproducción asistida donde la muestra enriquecida va a ser empleada.
322 En cuanto a la eficacia de las metodologías estudiadas, la técnica de Swim-up mostró
323 resultados positivos en cuanto a la recuperación espermática y su nivel de
324 fragmentación genómica. Sin embargo, el sistema microfluídico mostró ser la técnica
325 más eficaz, ya que logra proveer muestras prácticamente libres de espermatozoides
326 con su ADN fragmentado. A pesar de los resultados alentadores, aún se requiere de
327 más estudios que esclarezcan fehacientemente el proceso por el cual el sistema
328 microfluídico logra reducir dichos niveles de fragmentación.
329

330 **REFERENCIAS**

- 331 1. Agarwal A, Majzoub A, Baskaran S, Panner Selvam M K, Cho CL, Henkel R, Finelli R,
332 Leisegang K, Sengupta P, Barbarosie C, Parekh N, Alves MG, Ko E, Arafa M, Tadros
333 N, Ramasamy R, Kavoussi P, Ambar R, Kuchakulla M, Robert KA, Shah R. Sperm
334 DNA fragmentation: A new guideline for clinicians. *The World Journal of Men's*
335 *Health*. 2020; 38:412–471.
- 336 2. Martínez E, Bezazián C, Bezazián A, Lindl K, Peliquero A, Cattaneo A, Gnocchi D,
337 Irigoyen M, Tessari L, Martínez AG. Sperm DNA fragmentation and male age:
338 results of in vitro fertilization treatments. *JBRA Assist Reprod*. 2020; Nov 5. doi:
339 10.5935/1518-0557.20210018. Epub ahead of print. PMID: 34061484.
- 340 3. Ribas-Maynou J, Yeste M, Salas-Huetos A. The relationship between sperm
341 oxidative stress alterations and IVF/ICSI outcomes: A systematic review from
342 nonhuman mammals. *Biology*. 2020; 9:178.
- 343 4. Agarwal A, Panner Selvam MK, Baskaran S, Cho CL. Sperm DNA damage and its
344 impact on male reproductive health: a critical review for clinicians, reproductive
345 professionals and researchers. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2019;
346 19:443–457.
- 347 5. Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications
348 for fertility. *Reproduction*. 2020; 159:189-201.
- 349 6. Chianese R, Pierantoni R. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production
350 alters sperm quality. *Antioxidants*. 2021; 10:92.
- 351 7. Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat MS, Shafiee H, Anchan RM, Mutter GL,
352 Tüzel E, Demirci U. Selection of functional human sperm with higher DNA integrity

- 353 and fewer reactive oxygen species. *Advanced Healthcare Materials*. 2014; 3:1671-
354 1679.
- 355 8. Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC, Anchan RM, Mutter GL, Asghar W. Sperm
356 processing for advanced reproductive technologies: Where are we today?
357 *Biotechnology Advances*. 2016; 34:578–587.
- 358 9. Sequeira RC, Criswell T, Atala A, Yoo JJ. Microfluidic systems for assisted
359 reproductive technologies: advantages and potential applications. *Tissue*
360 *Engineering and Regenerative Medicine*. 2020; 17:787-800.
- 361 10. Vaughan DA, Sakkas D. Sperm selection methods in the 21st century. *Biology of*
362 *Reproduction*, 2019; 101:1076-1082.
- 363 11. Gode F, Gürbüz AS, Tamer B, Pala I, Isik AZ. The effects of microfluidic sperm
364 sorting, density gradient and swim-up methods on semen oxidation reduction
365 potential. *Urology Journal*. 2020; 17:397-401.
- 366 12. Parrella A, Keating D, Cheung S, Xie P, Stewart JD, Rosenwaks Z, Palermo GD. A
367 treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent
368 ART failure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2019; 36:2057-2066.
- 369 13. WHO World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and
370 Processing of Human Semen, 5th edn. Geneva: World Health Organization. 2010.
- 371 14. Muthigi A, Jahandideh S, Bishop LA, Naeemi FK, Shipley SK, O'Brien JE, Shin PR,
372 Devine K, Tanrikut C. Clarifying the relationship between total motile sperm counts
373 and intrauterine insemination pregnancy rates. *Fertility and Sterility*. 2021;
374 115:1454-1460.

- 375 15. Nosrati R, Graham PJ, Zhang B, Riordon J, Lagunov A, Hannam TG, Escobedo C, Jarvi
376 K, Sinton D. Microfluidics for sperm analysis and selection. *Nature Reviews.*
377 *Urology.* 2017; 14:707-730.
- 378 16. Samuel R, Feng H, Jafek A, Despain D, Jenkins T, Gale B. Microfluidic-based sperm
379 sorting analysis for treatment of male infertility. *Translational Andrology and*
380 *Urology.* 2018; 7:336-347.
- 381 17. Shirota K, Yotsumoto F, Itoh H, Obama H, Hidaka N, Nakajima K, Miyamoto S.
382 Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA
383 damage. *Fertility and Sterility.* 2016; 105:315–21.e1.
- 384 18. De Gheselle S, Deroose A, Stevens J, Hiel M, Tilleman K. A methodological
385 validation of an easy one-step swimout semen preparation procedure for selecting
386 DNA fragmentation-free spermatozoa for ICSI. *Andrologia.* 2020; 52:e13852.
- 387

388 **TABLAS**

389

390 Tabla 1. Parámetros seminales iniciales de las muestras empleadas en el Experimento 1

Parámetros seminales	
Volumen (ml)	2.9 ± 0.7
Concentración espermática (x10 ⁶ espermatozoides/ml)	63.0 ± 21.6
Espermatozoides totales (x10 ⁶)	182.3 ± 75.4
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	48.3 ± 9.4
Espermatozoides con movilidad in situ (%)	2.6 ± 0.2
Espermatozoides inmóviles (%)	49.2 ± 9.4

391

392

393 Tabla 2. Comparación de los parámetros seminales de las muestras luego de

394 procesamiento mediante gradiente de densidad y Swim-up

Parámetros seminales	Gradiente	Swim-up
Concentración espermática (x10 ⁶ espermatozoides/ml)	62.8 ± 23.2 a	32.4 ± 8.3 b
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	95.0 ± 4.1 a	98.4 ± 2.4 b
Espermatozoides progresivos totales (x10 ⁶)	24.0 ± 9.3 a	12.6 ± 3.3 b
Fragmentación del ADN espermático (%)	19.2 ± 5.1 a	9.1 ± 1.9 b

395 (a,b) en la misma línea difieren significativamente (p< 0.05)

396

397

398

399

400 Tabla 3. Parámetros seminales iniciales de las muestras empleadas en el Experimento 2

Parámetros seminales	
Volumen (ml)	2.8 ± 0.5
Concentración espermática (x10 ⁶ espermatozoides/ml)	105.7 ± 24.8
Espermatozoides totales (x10 ⁶)	297.2 ± 89.0
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	37.5 ± 10.5
Espermatozoides con movilidad in situ (%)	1.3 ± 0.6
Espermatozoides inmóviles (%)	61.2 ± 10.5

401

402

403 Tabla 4. Comparación de los parámetros seminales de las muestras luego de

404 procesamiento mediante Swim-up y ZyMöt

Parámetros seminales	Swim-up	ZyMöt
Concentración espermática (x10 ⁶ espermatozoides/ml)	19.6 ± 11.1 a	10.4 ± 6.6 b
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	97.9 ± 2.5 a	99.7 ± 1.2 b
Espermatozoides progresivos totales (x10 ⁶)	13.4 ± 3.5 a	8.9 ± 5.6 b
Fragmentación del ADN espermático (%)	9.1 ± 2.0 a	1.3 ± 0.7 b

405 (a,b) en la misma línea difieren significativamente (p< 0.05)

406

407 **FIGURAS**

408



409

410 Figura 1. Dispositivo microfluídico ZyMöt