



## SIMPOSIO: TECNOLOGÍA DE LABORATORIO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA SYMPOSIUM: LABORATORY TECHNOLOGY IN ASSISTED REPRODUCTION

# EVALUACIÓN DEL FACTOR MASCULINO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA: NUEVAS TECNOLOGÍAS

### Resumen

Los parámetros seminales analizados en un espermograma (concentración, motilidad, morfología) no discriminan claramente a pacientes con problemas de fertilidad. Por esto se hace necesaria la búsqueda de nuevos marcadores que nos permitan correlacionar la causa de la infertilidad de factor masculino con la probabilidad de lograr un embarazo a término. En los últimos años muchas investigaciones se han enfocado en el área molecular, evaluando la fragmentación del ADN y las aneuploidías cromosómicas del espermatozoide, lo cual ha llevado a denominarlas infertilidad de factor masculino genómico. Es así como actualmente se está aplicando metodologías que permiten seleccionar espermatozoides con un menor grado de estas patologías, para ser utilizados en procedimientos de reproducción asistida (RA). Entre ellas tenemos la selección morfológica de espermatozoides por alta magnificación (IMSI), las columnas de anexina-V y la selección espermática por unión al ácido hialurónico. En esta revisión detallaremos la utilidad de las pruebas de fragmentación de ADN y FISH en espermatozoides, como las técnicas de selección espermática en técnicas de RA.

**Palabras clave:** Reproducción asistida, fragmentación del ADN espermático, factor masculino genómico, selección espermática, inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente, selección de espermatozoides por su capacidad de unión a la zona pelúcida.

DR. JIMMY PORTELLA<sup>1</sup>, DRA. SOLEDAD SEPÚLVEDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo PRANOR de Reproducción Asistida. Lima-Perú

### Correspondencia:

Correo-e: soledads@fertilidadperu.com

Rev Per Ginecol Obstet. 2011; 57: 21-27

### Male factor evaluation in assisted reproduction: new technologies

### ABSTRACT

The seminal parameters analyzed in semen (concentration, motility, morphology) do not clearly discriminate patients with fertility problems. For this reason it is necessary to search for new markers that will allow us to correlate the cause of male factor infertility with the likelihood of achieving a pregnancy reaching term. In recent years much research has focused on the molecular area, assessing DNA fragmentation and sperm chromosome aneuploidy, which has led to the term 'genomic male factor infertility'. At present methodologies allow selection of sperm with less

pathology for use in assisted reproduction procedures (ART) including morphological selection of spermatozoa by high magnification (IMSI), columns of annexin-V, and sperm selection by hyaluronic acid binding. This review will detail the usefulness of testing both DNA fragmentation and FISH in sperm as sperm selection techniques in assisted reproduction.

**Key words:** Assisted reproduction, sperm DNA fragmentation, genomic male factor, sperm selection, IMSI, intracytoplasmic morphologically selected sperm injection, sperm selection by ability to join the zona pellucida - PICSITM.

### INTRODUCCIÓN

El espermatozoide, gameto masculino, es la célula encargada de llevar y transmitir la información genética del padre. Además, durante la fecundación aporta al ovocito el centriolo necesario para la división celular y un factor activador, llamado oscilina<sup>(1)</sup>. Ya que el espermatozoide aporta su genoma haploide, es importante la integridad de su ácido desoxirribonucleico (ADN) para la descendencia. Si bien espermatozoides con ADN dañado son capaces de fecundar un ovocito y lograr un



embarazo a término <sup>(2)</sup>, estudios en ratones demostraron que las consecuencias pueden ser observadas a largo plazo, tales como crecimiento anómalo, envejecimiento prematuro, conducta anormal y tumores <sup>(3)</sup>.

El análisis del semen es usado rutinariamente para evaluar la capacidad fértil del hombre. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una serie de parámetros que relacionan la calidad del semen con la fertilidad. Entre las características clásicas analizadas en el líquido seminal están: el volumen del eyaculado, el pH, el número de espermatozoides por unidad de volumen, la motilidad, la viabilidad y la morfología de los espermatozoides. Los últimos valores de referencia de las características del semen de la OMS son mostrados en la tabla 1 <sup>(4)</sup>. Sin embargo, el resultado de un espermatograma con valores normales no necesariamente correlaciona con el potencial de fertilidad. Prueba de ello es que un gran número de mujeres no logra tener un embarazo a pesar de la aparente ausencia de un factor masculino de infertilidad. Es muy probable que en muchas de estas parejas pueda existir un factor genómico, el cual puede incluir daño en el ADN espermático o aneuploidías.

La morfología espermática, a diferencia de los demás parámetros evaluados en una muestra seminal, ha sido ampliamente estudiada como un factor pronóstico del resultado en los ciclos de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Algunos autores sugieren que la morfología estricta de Kruger debe ser reconsiderada como valor diagnóstico, ya que se puede obtener tasas altas de embarazo en los procedimientos de ICSI aún en pacientes con teratozoospermia severa <sup>(5,6)</sup>. Sin embargo, Tang y col. <sup>(7)</sup> demostraron que las anomalías cromosómicas y la fragmentación del ADN dependen del tipo de anomalía morfológica en los espermatozoides del grupo de hombres teratozoospermicos com-

Tabla 1. Valores de referencia estándares para las características del semen, según manual de la OMS 2010.

Parámetro	Valor mínimo de referencia
Volumen de semen	1,5 mL
pH	7,2
Nº total de espermatozoides/eyaculado	39 millones
Nº de espermatozoides/mL	15 millones
Motilidad total (progresiva + no progresiva)	40%
Motilidad progresiva	32%
Vitalidad	58%
Morfología espermática*	4%

\*criterio de Kruger

parado al grupo de hombres fértiles. Además, la tasa de aneuploidía cromosómica y fragmentación del ADN fue mayor en el grupo teratozoospermico que en el grupo fértil <sup>(7)</sup>. Por otro lado, se ha sugerido un efecto paterno sobre el desarrollo embrionario. El efecto paterno temprano estaría asociado con defectos del centrómero espermático o deficiencias del factor activador del ovocito, manifestándose desde las fallas de fecundación hasta las alteraciones en la calidad del desarrollo embrionario hasta el estadio de 4 células <sup>(8)</sup>. El efecto paterno tardío estaría relacionado con la fragmentación del ADN y aneuploidías cromosómicas del espermatozoide, manifestándose con el bloqueo del desarrollo embrionario después de la activación genómica del embrión, que ocurre en el paso de 4 a 8 células <sup>(9)</sup>, o con pérdida de la viabilidad embrionaria, luego de la implantación, en ciclos de ICSI <sup>(10)</sup>.

El propósito de esta revisión es dar a conocer los factores genómicos involucrados en la infertilidad de factor masculino no observados en la evaluación clásica del líquido seminal. Posteriormente, se detallará las nuevas técnicas de selección espermática utilizadas en las técnicas de reproducción asistida (IRA).

## INFERTILIDAD DE FACTOR MASCULINO GENÓMICO

Actualmente, la concentración, movilidad y morfología espermática no son características suficien-

tes para distinguir a los hombres fértiles de los infértiles. Por esto, son necesarios nuevos marcadores para diagnosticar el factor masculino y poder predecir el éxito del resultado de un tratamiento de RA. En este contexto, en los últimos años se ha estudiado la integridad nuclear del ADN del espermatozoide <sup>(11)</sup> como causa de infertilidad masculina. Así mismo, se ha estudiado las anomalías cromosómicas en el espermatozoide, aneuploidías, mostrando un rol importante en la etiología de la infertilidad <sup>(12)</sup>.

## ANEUPLOIDÍA ESPERMÁTICA

Las aneuploidías cromosómicas pueden surgir como un evento de novo o bien durante la meiosis (materna o paterna) o durante la mitosis poco después de la fecundación <sup>(13)</sup>. Por ello, la transmisión de un complemento cromosómico haploide del espermatozoide al ovocito es crucial, ya que la aneuploidía embrionaria es generalmente asociada con letalidad o anomalías en el feto <sup>(14)</sup>. Diversos estudios han mostrado que los hombres infértiles podrían tener un alto riesgo de producir espermatozoides con aneuploidías <sup>(12,15)</sup>, especialmente el grupo de pacientes con oligoastenoteratozoospermia (OAT) <sup>(16)</sup>. Este grupo de pacientes se beneficia con la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI); por lo tanto, la transmisión de estas anomalías puede ser facilitada a través de la ICSI <sup>(12,17)</sup>.



La hibridación fluorescente in situ (FISH) es una técnica indirecta que ha demostrado ser un buen método para determinar el contenido cromosómico del gameto masculino. La FISH es simple y permite analizar un gran número de células a la vez. Sin embargo, la técnica tiene algunas desventajas, ya que solo brinda datos de los cromosomas investigados y la detección de aberraciones estructurales es limitada. El análisis de FISH en espermatozoides podría ser útil en hombres con: (a) anomalías cromosómicas sexuales numéricas; (b) anomalías estructurales cromosómicas; (c) oligozoospermia severa o con OAT. Y en parejas con historia de abortos recurrentes o fallas repetidas en TRA. Se recomienda por lo tanto, dar consejería genética a las parejas con factor masculino que podrían estar en riesgo de tener una descendencia aneuploide, antes de proceder con la ICSI <sup>(12,16)</sup> o, de llevarla a cabo, acompañar el procedimiento con un diagnóstico genético preimplantacional <sup>(12,13,18)</sup>.

### FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

El daño del ADN en el espermatozoide tiene un efecto negativo tanto en el resultado reproductivo in vivo como in vitro <sup>(11)</sup>. Sin embargo, este efecto será dependiente del grado del daño del ADN espermático, así como de la capacidad del ovocito de reparar dicho daño. Además, el mecanismo de reparación del ADN del ovocito es limitado, obediendo a la calidad citoplasmática y genómica, que a su vez dependen de la edad materna. El daño del ADN en el espermatozoide puede darse a nivel mitocondrial y nuclear, a través de diversos mecanismos: (1) apoptosis durante la espermatogénesis; (2) rotura de las cadenas de ADN durante el remodelamiento de la cromatina espermática durante el proceso de espermiogénesis; (3) fragmentación del ADN post-testicular, inducido por especies reactivas de oxígeno durante el transporte de los espermatozoides a través de los túbulos

seminíferos y el epidídimo; (4) daño del ADN inducido por radioterapia y quimioterapia; (5) daño del ADN inducido por tóxicos ambientales. De todos ellos, el daño post-testicular (en el epidídimo) es la principal causa de fragmentación del ADN espermático. Un estudio reciente ha confirmado esta hipótesis, demostrando que los espermatozoides eyaculados tienen significativamente mayor daño en el ADN que los espermatozoides testiculares colectados ambos el mismo día en pacientes que fallaron a un tratamiento previo con antioxidantes orales <sup>(19)</sup>.

Existen diversas metodologías para el análisis de la fragmentación del ADN en el espermatozoide. Sin embargo, un aspecto importante que debe ser considerado cuando se evalúa el grado de fragmentación del ADN, es el tipo de rotura de la hebra de ADN (hebra simple o doble) y si se requiere un paso previo de desnaturalización de la hebra de ADN en un pH ácido o alcalino. Entre las pruebas tenemos: TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), ISNT (*in-situ nick translation*), cometa, DBD-FISH (*DNA break detection FISH*), prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD), ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) <sup>(20)</sup> (figura 1).

Cuando el espermatozoide se fusiona con el ovocito y el material

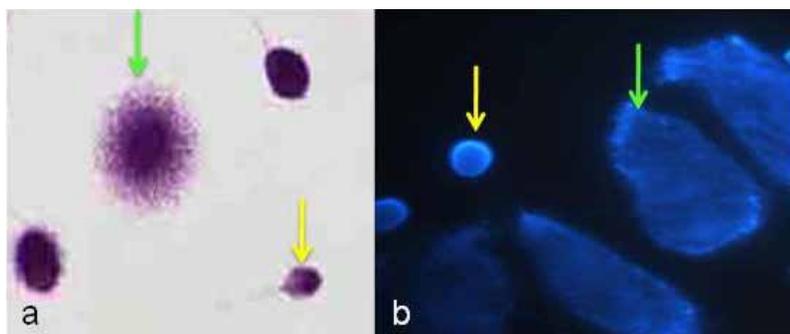
genético es incorporado, este descompactará en un ambiente con pH neutro. Si hay daño del ADN en el espermatozoide, el de cadena simple es de mejor pronóstico y más fácil de reparar por el ovocito que un daño del ADN de doble cadena. En este sentido, la prueba de TUNEL es la más indicada, por ser un método directo que mide el daño del ADN al no requerir un paso previo de desnaturalización y evaluar el daño del ADN, tanto en cadena simple como en cadena doble.

Los pacientes indicados para realizar el estudio de la fragmentación espermática son: (a) infertilidad idiopática; (b) fallos repetidos en TRA; (c) mala calidad embrionaria en ciclos previos de FIV/ICSI; (d) pacientes con abortos de repetición; (e) hombres con edades mayores de 40 años.

### SELECCIÓN ESPERMÁTICA EN TRA

La evaluación de la fragmentación del ADN y el análisis de la aneuploidía cromosómica en los espermatozoides no pueden ser aplicadas en tiempo real cuando uno debe escoger los espermatozoides libres de estas patologías en los procedimientos de ICSI. Por lo tanto, existe la necesidad de técnicas que permitan seleccionar espermatozoides 'normales genómicamente', las que están siendo aplicadas actualmente con resultados aún controversiales.

**Figura 1. Fragmentación de ADN. a) prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD). b) SCD modificado para fluorescencia. Obsérvese espermatozoides dañados (flechas amarillas) y espermatozoides sanos descompactados (flechas verdes).**



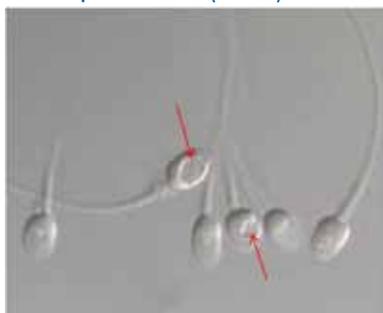


### ASPECTO MORFOLÓGICO: ALTA MAGNIFICACIÓN

La introducción de un nuevo concepto llamado “evaluación de la morfología de organelas del espermatozoide móvil” (MSOME) permite examinar espermatozoides en tiempo real. Este método es desarrollado en un microscopio de luz invertido equipado con un sistema óptico de Nomarski (contraste de interferencia diferencial, DIC) y un sistema digital para obtener una magnificación final de aproximadamente 6300x<sup>(21)</sup>. Seis estructuras subcelulares del espermatozoide pueden ser analizadas con este sistema (acrosoma, lámina post-acrosomal, cuello, mitocondrias, cola y núcleo). Así, Bartoov y col<sup>(21)</sup> definieron un espermatozoide normal cuando la cabeza es de forma oval, lisa y simétrica con  $4,75 \pm 0,28 \mu\text{m}$  de largo y  $3,28 \pm 0,20 \mu\text{m}$ , sin alteraciones nucleares regionales y no más de una vacuola que ocupe menos del 4% del área nuclear. El cuello o pieza intermedia debe ser axial y no debe contener gota citoplasmática.

La combinación del MSOME y el ICSI es llamada “inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente” (IMSI). El proceso de selección espermática con la IMSI tiene un rango promedio de duración entre 1,5 a 5 horas, a diferencia de la ICSI convencional, donde el tiempo de selección espermática es menor a 5 minutos a una magnificación de hasta 400x (figura 2).

**Figura 2. Selección morfológica de espermatozoides en alta magnificación. IMSI. Obsérvese la presencia de vacuolas en la cabeza de los espermatozoides (flechas).**



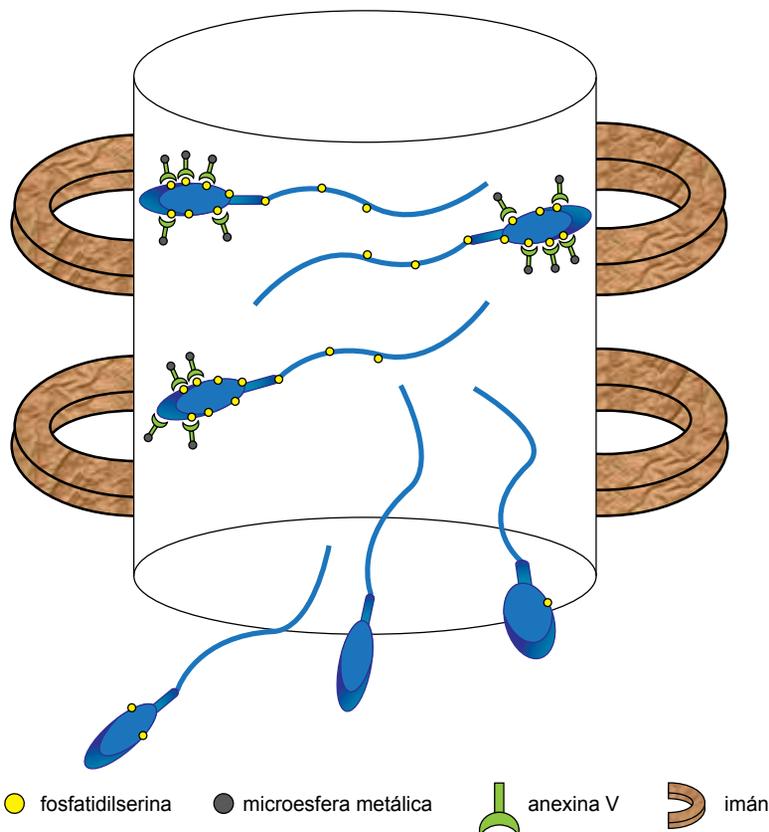
Recientemente, Souza Setti y col<sup>(22)</sup> publicaron el primer metaanálisis que compara los resultados reproductivos entre la ICSI convencional y la IMSI. La tasa de fecundación no fue diferente entre los 2 grupos estudiados. Sin embargo, la tasa de implantación (OR 2,72; IC95% 1,50 a 4,95) y la tasa de embarazo (OR 3,12; IC95% 1,55 a 6,26) fueron significativamente mejoradas en los ciclos de IMSI. Además, la tasa de aborto disminuyó significativamente (OR 0,42; IC95% 0,23 a 0,78) en los ciclos de IMSI comparado con los ciclos de ICSI.

Una de las características más resaltantes observadas en magnificación alta es la presencia de vacuolas en el área nuclear del espermatozoide. Varios investigadores trataron de establecer una clasificación MSOME estandarizada con respecto al porcentaje límite que estas vacuolas

deben ocupar en la cabeza del espermatozoide, para que sean consideradas dentro de lo normal<sup>(21-25)</sup>. Las vacuolas nucleares del espermatozoide han demostrado tener un gran impacto negativo sobre el desarrollo embrionario hasta el estado de blastocisto<sup>(23,24)</sup>. El origen de estas vacuolas espermáticas no es claro. Estas han sido asociadas a la fragmentación del ADN<sup>(26,27)</sup>, acrosoma intacto no reaccionado<sup>(28)</sup>, alteración de la condensación de la cromatina<sup>(25)</sup> y aneuploidías<sup>(25)</sup>.

La IMSI es recomendada de acuerdo a una indicación específica, tal como diferentes grados de teratozoospermia, fallas previas de implantación, ausencia de formación de blastocistos en ciclos previos, pacientes con porcentajes elevados de fragmentación de ADN espermático. Sin embargo, en casos de teratozoospermia y oligozoospermia

**Figura 3. Mecanismo de acción de las columnas de anexina V. Al ocurrir la apoptosis, las células exponen en su membrana un fosfolípido denominado fosfatidilserina, el cual tiene afinidad por anexina V. Se hace pasar los espermatozoides por columnas de anexina V unida a esferas de metal. Así, los espermatozoides dañados quedan atrapados en su viaje y se recoge los intactos.**





severa el uso de IMSI será limitado, ya que la probabilidad de selección por MSOME no será posible. Además, el efecto de la IMSI seleccionando los mejores espermatozoides se manifestará cuando sea desarrollado conjuntamente con el cultivo embrionario hasta el día 5<sup>(23,24)</sup>.

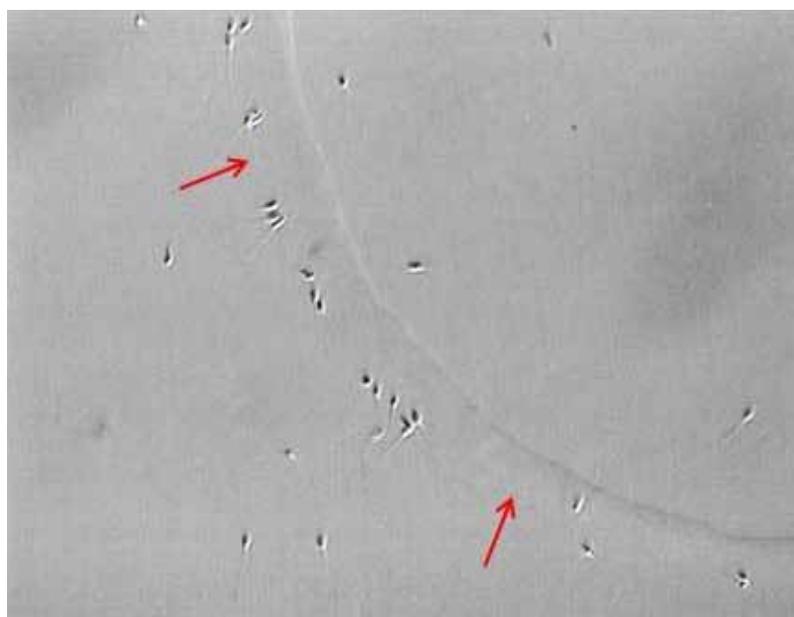
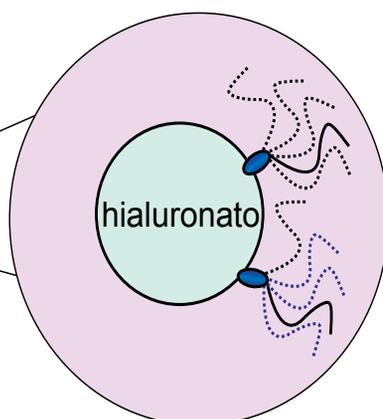
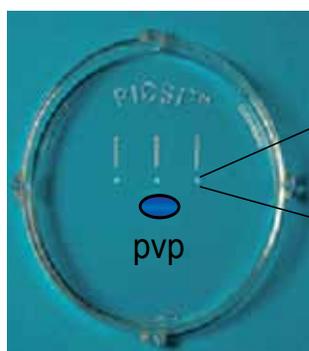
### ASPECTO MOLECULAR: COLUMNAS DE ANEXINA-V

La separación magnética por columnas de anexina-V (MACS – *magnetic-activated cell sorting*), ‘filtrado molecular’, es una técnica que permite aislar espermatozoides libres de marcadores apoptóticos<sup>(29,30)</sup>. Consiste en unas microesferas metá-

licas conjugadas con anexina-V con alta afinidad por la fosfatidilserina (PS). Este fosfolípido se encuentra normalmente en la cara interna de la membrana plasmática y es externalizado o expuesto en la cara externa de la membrana plasmática, a causa de un evento apoptótico, por lo cual es considerado un marcador temprano de apoptosis (figura 3).

La técnica se fundamenta en que el magneto retiene aquellos espermatozoides con PS expuesta y que están unidos a la anexina-V (fracción positiva), mientras que aquellos no unidos a la anexina-V pasarán libremente a través de la columna (fracción negativa)<sup>(29,30)</sup>.

**Figura 4. Selección de espermatozoides por PICSI®. Cápsula con hialuronato, donde se adhieren los espermatozoides (flechas), que luego serán seleccionados para realizar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).**



Consecuentemente, podemos obtener una población espermática correspondiente a la fracción negativa (no apoptóticos) con niveles bajos de fragmentación de ADN que pueden ser utilizados exitosamente en TRA<sup>(31-33)</sup>.

Esta técnica es un método no invasivo para separar espermatozoides que contengan el ADN fragmentado como consecuencia de un proceso apoptótico. Por lo cual, es útil en pacientes que presenten un alto porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN, en parejas con mala calidad embrionaria en ciclos previos de FIV o en casos de infertilidad inexplicada.

### ASPECTO FISIOLÓGICO: ZONA PELÚCIDA ARTIFICIAL

El ovocito humano está rodeado por la zona pelúcida (ZP), cuyo principal componente es el ácido hialurónico (AH). Los espermatozoides maduros son aquellos que han completado la madurez nuclear, extrusión citoplasmática, remodelamiento de su membrana plasmática<sup>(34)</sup> y poseen sitios de unión al ácido hialurónico, lo que les permite atravesar el complejo cúmulo-corona y unirse a la ZP, hecho comprobado también *in vitro*<sup>(34)</sup>. El sistema de la ZP artificial consiste en una placa Petri que posee 3 sitios de unión, cada una con una película de AH, las cuales deben ser previamente hidratadas antes de colocar los espermatozoides. Solo aquellos espermatozoides maduros se unirán por la cabeza a la base de AH y girarán sobre su propio eje batiendo intensamente la cola. Este sistema es conocido comercialmente como PICSI® (figura 4).

Esta técnica es una buena alternativa para seleccionar espermatozoides fisiológicamente maduros para ser utilizados posteriormente en la ICSI. Diferentes estudios han reportado que los espermatozoides seleccionados por unión al AH presentan una menor fragmentación del ADN<sup>(35-37)</sup>, menor frecuencia



de aneuploidías cromosómicas<sup>(38)</sup> y buena morfología nuclear<sup>(35-37)</sup>. Al comparar los resultados reproductivos en los ciclos de ICSI a través de la selección espermática convencional (PVP) con la selección por unión al AH, se encontró una mejor tasa de fecundación<sup>(35)</sup>, mejor calidad embrionaria<sup>(37, 39)</sup> y mejor tasa de implantación<sup>(37)</sup>, en el grupo seleccionado por AH. Sin embargo, ningún estudio encontró diferencias en cuanto a tasa de embarazo y tasa de aborto<sup>(35-37,39)</sup>.

El uso del AH como método de selección espermática durante la ICSI sería de interés en pacientes con niveles altos de fragmentación del ADN, tasas bajas o nulas de fecundación en ciclos previos y parejas con mala calidad embrionaria.

## CONCLUSIONES

El estudio de la fragmentación de ADN para evaluar la integridad de la cromatina nuclear y la prueba de FISH para evaluar las aneuploidías cromosómicas en espermatozoides son nuevos marcadores en la evaluación del factor masculino genómico. Diferentes técnicas de selección espermática aplicadas junto con el FIV/ICSI han sido utilizadas en los últimos años, en las cuales se busca escoger espermatozoides libres o al menos con el menor grado de fragmentación de ADN y con una constitución cromosómica haploide. Entre las técnicas tenemos la selección de espermatozoides en alta magnificación (IMSI), adherencia al AH (PICSI) y columnas de anexina-V (MACS) El uso de estas técnicas consume tiempo de trabajo en el laboratorio, por lo cual son aplicadas en pacientes seleccionados con pronóstico pobre debido a factores paternos y caracterizados por fallas repetidas en ciclos de FIV/ICSI. Dependiendo del caso, se puede hacer una combinación de las diferentes técnicas. A la fecha, son pocos los datos reportados aplicando estas técnicas de selección espermática, por lo que son necesarios estudios prospectivos al azar, para confirmar la eficacia de estos métodos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*. 1996;379:364-8.
2. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod*. 2004;19(6):1409-17.
3. Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Alvarez P, de Dios Hourcade J, de Fonseca FR, Gutiérrez-Adán A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod*. 2008;78(4):761-72.
4. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsohn KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):231-45.
5. McKenzie LJ, Kovanci E, Amato P, Cisneros P, Lamb D, Carson SA. Pregnancy outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with profound teratospermia. *Fertil Steril* 2004;82:847-9.
6. French DB, Sabanegh ES Jr, Goldfarb J, Desai N. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertil Steril*. 2010;93(4):1097-103.
7. Tang SS, Gao H, Zhao Y, Ma S. Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *Int J Androl*. 2010;33(1):e163-79.
8. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod*. 2002;17(1):184-9.
9. Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, van Wissen LC, Ignouli-Vanvuchelen R, Bergers-Jansen JM, Derhaag JG, Geraedts JP, Evers JL. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional
10. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*. 2006;21(11):2876-81.
11. Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(1):3-12.
12. Tempest HG, Martin RH. Cytogenetic risks in chromosomally normal infertile men. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009;21(3):223-7.
13. Vialard F, Hammoud I, Molina-Gomes D, Wainer R, Bergere M, Albert M, et al. Gamete cytogenetic study in couples with implantation failure: aneuploidy rate is increased in both couple members. *J Assist Reprod Genet*. 2008;25(11-12):539-45.
14. Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*. 2000;6(1):93-105.
15. Bernardini LM, Calogero AE, Bottazzi C, Lanteri S, Venturini PL, Burrello N, De Palma A, Conte N, Ragni N. Low total normal motile count values are associated with increased sperm disomy and diploidy rates in infertile patients. *Int J Androl*. 2005;28(6):328-36.
16. Durakbasi-Dursun HG, Zamani AG, Kutlu R, Görkemli H, Bahce M, Acar A. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoastheno-teratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. *Fertil Steril*. 2008;89(6):1709-17.
17. Tang SS, Gao H, Robinson WP, Ho Yuen B, Ma S. An association between sex chromosomal aneuploidy in sperm and an abortus with 45,X of paternal origin: possible transmission of chromosomal abnormalities through ICSI. *Hum Reprod*. 2004;19(1):147-51.



18. Sánchez-Castro M, Jiménez-Macedo AR, Sandalinas M, Blanco J. Prognostic value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis over PGD. *Hum Reprod.* 2009;24(6):1516-21.
19. Moskovtsev SI, Jarvi K, Mullen JB, Cadesky KI, Hannam T, Lo KC. Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1142-6.
20. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl.* 2009;30(3):219-29.
21. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl.* 2002;23(1):1-8.
22. Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cássia Sávio Figueira R, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2010;21(4):450-5.
23. Van der Zwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S, et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online.* 2008;17(5):617-27.
24. Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, Jellad S, Vanderzwalmen P, Balet R, Larue L, Barak Y. A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertil Steril.* 2009;92:1616-1625.
25. Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, Mousset-Siméon N, Macé B, Rives N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod.* 2010 Nov 18. (En prensa)
26. Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2008;17(1):42-5.
27. Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Silva LF, Vagnini LD, Franco JG Jr. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. *Fertil Steril.* 2010;94(5):1937-40.
28. Kacem O, Sifer C, Barraud-Lange V, Ducot B, De Ziegler D, Poirot C, Wolf J. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organelle morphological examination, are mostly of acrosomal origin. *Reprod Biomed Online.* 2010;20(1):132-7.
29. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Baumann T, Kriegel C, Li L, Agarwal A. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online.* 2005;10(6):740-6.
30. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander HJ, Thomas AJ Jr, Paasch U. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod.* 2006;74(3):530-7.
31. Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Uğurlu M, Cam-sari C, Kanyilmaz O, Kaya A, Unsal A. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25(8):375-81.
32. Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedó C, Carro M, Papier S, Nodar F. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2010;20(3):320-3.
33. Polak de Fried E, Denaday F. Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertil Steril.* 2010;94(1):351.e15-8
34. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavacki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril.* 2003;79 Suppl 3:1616-24.
35. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalaee M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25(5):197-203.
36. Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D, Serrao L, Fava L, Scaravelli G, Borini A. Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online.* 2009;19 Suppl 3:35-43.
37. Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet.* 2010a;27(1):13-6.
38. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril.* 2005;84(6):1665-73.
39. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. "Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryoquality. *Fertil Steril.* 2010b;93(2):598-604.