

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL



APOPTOSIS ESPERMÁTICA EN PACIENTES DE T.R.A. Y COLUMNAS DE ANEXINA



Beatriz de Arriba Ruiz

TUTOR: Jose Luis de Pablo Franco

Quisiera expresar mis agradecimientos a todo el personal de la Clínica de Reproducción Asistida Quirón Bilbao, y en especial al Dr. Jose L. de Pablo Franco por dirigir este trabajo, y a la Dra. Aitziber Domingo Bilbao, por su tiempo y dedicación.

Asimismo, quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que me han apoyado durante este proyecto.

“Hay un solo niño bello en el mundo y cada madre lo tiene”

(José Martí)

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AN: Anexina.

CD45: *Cluster of Determination 45 (pan-leukocyte marker)*.

CP3: Caspasa-3.

CP8: Caspasa-8.

CP9: Caspasa-9.

DGC: *Density Gradient Centrifugation* (Centrifugación en Gradientes de Densidad).

FasL: *Fibroblasts Associated Ligand* (Ligando Asociado a Fibroblastos).

FCM: *Flow Cytometry* (Citometría de Flujo).

FITC: *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína).

FIV: Fecundación *In Vitro*.

FL1: *Forward Light 1*.

FL2: *Forward Light 2*.

FSC: *Forward Scatter* (Dispersión Frontal).

ICMART: *International Committee Monitoring Assisted Reproductive Technologies* (Comité Internacional para la Supervisión de Técnicas de Reproducción Asistida).

ICSI: *Intracytoplasmic Sperm Injection* (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides).

IP: Ioduro de Propidio.

LRI: Límite de Referencia Inferior.

MACS: *Magnetic-Activated Cell Sorting* (Separación Magnética por Columnas de Anexina).

MMP: *Mitochondrial Membrane Potential* (Potencial de Membrana Mitocondrial).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PS: *Phosphatidylserine* (Fosfatidilserina).

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Especies Reactivas de Oxígeno).

rpm: *Revolutions Per Minute* (Revoluciones Por Minuto).

SD: *Standard Deviation* (Desviación Estándar).

SSC: *Side Scatter* (Dispersión Lateral).

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	8
1.1.- Concepto de apoptosis	12
1.2.- Marcadores de apoptosis	14
1.3.- Estudio de apoptosis espermática	19
1.4.- Reducción de apoptosis espermática	21
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	25
3.1.- Población de estudio	25
3.2.- Muestras seminales	25
3.2.1.- Obtención de las muestras	25
3.2.2.- Recogida de datos	25
3.3.- Evaluación de muestras seminales	26
3.4.- Gradientes de densidad	27
3.5.- Ensayo de unión a Anexina V/IP	27
3.5.1.- Preparación de las muestras	27
3.5.2.- Detección de apoptosis espermática por citometría de flujo.....	29
3.6.- Separación de espermatozoides no apoptóticos mediante MACS	30
4.- RESULTADOS	32
5.- DISCUSIÓN	39
6.- CONCLUSIONES	45
7.- BIBLIOGRAFÍA	46

1.- INTRODUCCIÓN

Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) se han convertido en los últimos años en el tratamiento de elección de parejas que presentan algún tipo de infertilidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité Internacional para la Supervisión de Técnicas de Reproducción Asistida (ICMART), definen el término **infertilidad** como una enfermedad del sistema reproductor que conlleva la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de doce meses o más de relaciones sexuales sin protección regular (1).

Se estima que este trastorno afecta en torno al 8-12% de la población en edad reproductiva, siendo la infertilidad masculina responsable de aproximadamente el 30% de los casos (2). Estos datos se traducen en cerca de un millón de parejas demandantes de TRA en nuestro país, situando a España en el tercer puesto, detrás de Francia y Alemania, en tratamientos realizados dentro del continente europeo (3).

La calidad del semen empleado en TRA ha pasado a considerarse uno de los factores determinantes en el éxito de estas técnicas (4). Actualmente, la aplicación de metodologías de rutina para la preparación de las muestras seminales constituye una herramienta básica dentro de los procedimientos incluidos en TRA (5). La realización de **seminogramas** en los laboratorios de andrología es una técnica convencional dentro de las unidades de reproducción asistida que permite analizar mediante microscopía óptica la concentración, movilidad y morfología, entre otros parámetros seminales, con el fin de diagnosticar alguna patología en varones infértiles. Estos parámetros cumplen con los criterios de referencia establecidos por la OMS en el año 2010 (6) (Tabla 1-2). Sin embargo, estos valores estándar fueron obtenidos a partir de poblaciones definidas libremente y generados por distintos laboratorios con técnicas y sistemas de garantía de calidad variables (7). Este hecho, junto a la subjetividad de los laboratorios en la estimación de los parámetros seminales, cataloga a estos análisis rutinarios como pobres indicadores del potencial de fertilidad masculina (8).

Tabla 1. Valores del Límite de Referencia Inferior (LRI) contemplados en el manual de la OMS 2010 (6).

PARÁMETRO SEMINAL	LÍMITE DE REFERENCIA INFERIOR (LRI)
Licuefacción (minutos)	Total a los 60 minutos
Aspecto	
Viscosidad (formación de hilos, cm)	< 2
pH	≥ 7,2
Volumen seminal (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Número de espermatozoides total (10 ⁶ /eyaculado)	39 (33-46)
Concentración espermática (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Movilidad total (A+B+C, %)	40 (38-42)
Movilidad progresiva (A+B, %)	32 (31-34)
Vitalidad (espermatozoides vivos, %)	58 (55-63)
Morfología (formas normales, %)	4 (3-4)
Peroxidasa-Leucocitos (10 ⁶ /ml)	< 1
MAR-Test (espermatozoides móviles con partículas unidas, %)	< 50
Test inmunológico (espermatozoides móviles con partículas unidas, %)	< 50
Zinc (μmol/eyaculado)	≥ 2,4
Fructosa (μmol/eyaculado)	≥ 13
Glucosidasa neutral (mU/eyaculado)	≥ 20

Tabla 2. Denominación y descripción de patologías seminales según el manual de la OMS 2010 (6).

PATOLOGÍA SEMINAL	DESCRIPCIÓN
Aspermia	Ausencia de semen (o eyaculación retrógrada)
Astenozoospermia	Porcentaje de movilidad progresiva por debajo del LRI
Astenoteratozoospermia	Porcentajes de movilidad progresiva y morfología normal por debajo del LRI
Azoospermia	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado
Criptozoospermia	Espermatozoides no observados en el eyaculado en fresco, pero sí en el <i>pellet</i> tras el centrifugado
Hematospermia	Presencia de eritrocitos en el eyaculado
Leucocitospermia	Presencia de leucocitos en el eyaculado por encima del LRI
Necrozoospermia	Bajo porcentaje de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado
Normozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentajes de movilidad progresiva y morfología normal igual o por encima del LRI
Oligoastenozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentaje de movilidad progresiva por debajo del LRI
Oligoastenoteratozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentajes de movilidad progresiva y morfología normal por debajo del LRI
Oligoteratozoospermia	Número total de espermatozoides y porcentaje de morfología normal por debajo del LRI
Oligozoospermia	Número total de espermatozoides por debajo del LRI
Teratozoospermia	Porcentaje de morfología normal por debajo del LRI

Con la introducción de la reproducción asistida, especialmente de la Fecundación *In Vitro* (FIV), durante la década de 1980, se desarrolló una amplia gama de diferentes métodos de separación de espermatozoides móviles (5).

El método más clásico y utilizado para la separación de espermatozoides se denomina *Swim-up*, originalmente descrito por *Mahadevan* y *Baker*. Su fundamento se basa en el movimiento activo de los espermatozoides desde el *pellet* celular al sobrenadante (9). El *Swim-up* es considerado la técnica más fisiológica para la separación de espermatozoides y resulta adecuado para muestras con buenos parámetros seminales. Sin embargo, el rendimiento de este método se ve comprometido por la superposición de capas celulares presentes en el *pellet* del centrifugado, pudiendo desplazar a los espermatozoides con mayor movilidad al fondo del tubo. También se ha demostrado una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides con una cromatina normal condensada tras la práctica de este procedimiento. Otra desventaja importante del *Swim-up* es el estrecho contacto que alcanzan los espermatozoides en el proceso de sedimentación con el resto de células y leucocitos, responsables de la alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas sustancias son capaces de alterar los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas plasmáticas de los espermatozoides, originando peroxidación lipídica, lo que se traduce en una disminución de la movilidad espermática (10).

Otra técnica ampliamente utilizada para la separación de espermatozoides es la **Centrifugación en Gradientes de Densidad (DGC)**. Se trata de un método menos fisiológico que el anterior, adecuado para muestras con bajos parámetros seminales, presentando buenos resultados en muestras pobres o congeladas. Los gradientes de densidad son capaces de disgregar y distribuir de manera diferencial los distintos componentes de las muestras seminales en función de su densidad. De esta forma, tras la centrifugación, los espermatozoides con mejor movilidad y morfología son células más compactadas y, en consecuencia, más densas, que atravesarán los gradientes hasta alcanzar el fondo del tubo constituyendo el sedimento. Así, el plasma seminal

permanecerá flotando sobre el gradiente de menor densidad y el resto de constituyentes, como los espermatozoides inmaduros y muertos, los leucocitos y las toxinas solubles, se situarán en la interfase entre ambos gradientes (5).

A pesar de que estas técnicas convencionales aportan considerable información sobre las características de las muestras y resultan en la selección de un número suficiente de espermatozoides móviles, fenómenos moleculares como la apoptosis espermática no son evaluados mediante estos procedimientos, pudiendo ser este fenómeno parcialmente responsable de las bajas tasas de fecundación y de implantación en reproducción asistida (11). Este hecho, junto al incremento de la demanda de las TRA, ha propiciado el desarrollo y uso de técnicas complementarias en los procedimientos de rutina que garanticen un rendimiento óptimo en la separación de espermatozoides funcionalmente competentes para fines de fecundación.

1.1.- Concepto de apoptosis

El término "**muerte celular programada**" fue utilizado originalmente por *Lockshin* y *Williams* en 1964 para describir una serie de eventos programados que conducían a la eliminación de células durante el desarrollo del organismo. Más tarde, en 1972, *Kerr* y su grupo (12) acuñaron el término "**apoptosis**" al conjunto de alteraciones celulares morfológicas y bioquímicas que suponían la muerte de la célula. Este fenómeno juega un papel importante en el desarrollo y homeostasis de los organismos multicelulares, actuando como un mecanismo de defensa mediante la eliminación de células no deseadas o potencialmente peligrosas para el organismo (13).

La apoptosis o muerte celular programada puede originarse en respuesta a estímulos específicos, tales como la privación de factores de supervivencia, la exposición a la radiación ionizante y a agentes quimioterapéuticos o la activación por diversos factores de muerte celular, o bien ser inducida como consecuencia de una lesión o estrés celular. Cada vez es más reconocida la relación existente entre este tipo de muerte celular fisiológica y la patogénesis de diversas enfermedades humanas

incluyendo cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, trastornos neurodegenerativos, aterosclerosis o miocardiopatía (14) (15).

El proceso de apoptosis comprende una serie de cambios morfológicos y bioquímicos bien definidos, entre los que se incluyen una contracción y consecuente reducción del volumen celular, vesiculación, condensación de la cromatina y creación de cuerpos apoptóticos. Por su parte, la **necrosis** o muerte celular por accidente, es un proceso pasivo que no requiere gasto energético de la célula y que se produce en respuesta a una amplia variedad de agentes nocivos. Durante la necrosis, las células se hinchan y lisan, liberando el contenido celular afectando, de esta forma, a las células contiguas y desencadenándose, finalmente, una respuesta inflamatoria (16). Sin embargo, en la apoptosis las células muertas son rápidamente fagocitadas, impidiendo la lisis celular y, en consecuencia, una reacción inflamatoria (Figura 1).

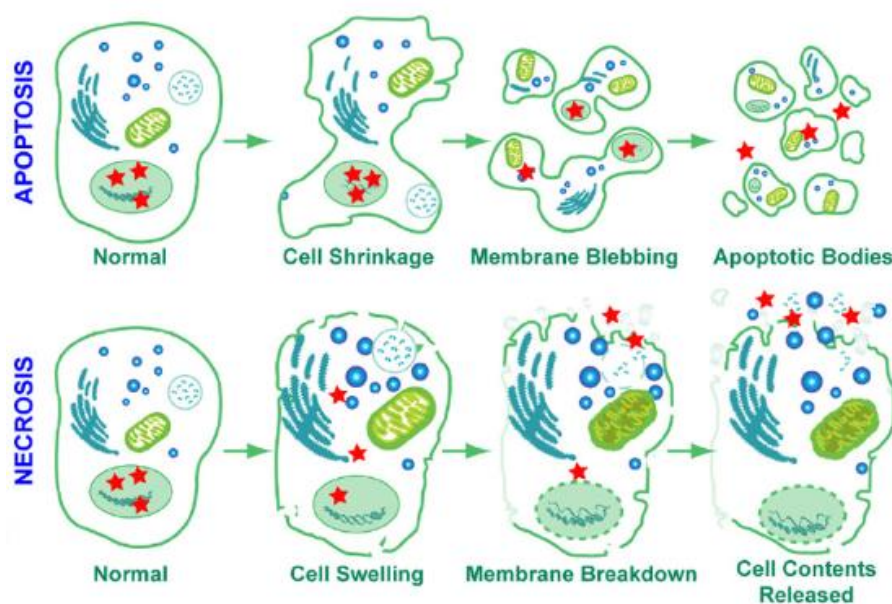


Figura 1. Cambios celulares durante los dos tipos de muerte celular. En la apoptosis tiene lugar un proceso de retracción celular, vesiculación y creación de cuerpos apoptóticos. En este tipo de muerte celular, la célula es rápidamente fagocitada, impidiendo la liberación de su contenido celular. En la necrosis, la célula sufre un aumento de volumen, terminando por lisis y liberar el contenido celular, provocando inflamación (modificado de Tang y cols., 2012) (17).

1.2.- Marcadores de apoptosis

Durante las primeras etapas de la apoptosis, las células sufren un proceso de asimetría en sus membranas y de cambios en su composición lipídica, caracterizada principalmente por la **externalización de la fosfatidilserina (PS) (18)**. La exposición de este fosfolípido de carga molecular negativa, desde su ubicación normal en la cara citosólica de las membranas de las células sanas a su superficie exterior, ha sido catalogada como una de las primeras características presentes en los espermatozoides humanos apoptóticos (19) (20).

La PS tiene una afinidad elevada y selectiva por la **Anexina V**, una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio con un peso molecular de 35-36 kD (21) (22). La Anexina, descubierta inicialmente como una proteína vascular con fuertes propiedades anticoagulantes (23), no puede atravesar una membrana plasmática intacta, por lo tanto, la unión de esta molécula con la PS sólo ocurre en aquellos espermatozoides apoptóticos, cuya membrana plasmática ha sido alterada, dejando expuesto el fosfolípido en su superficie celular (24). Esta translocación, junto con la condensación de la cromatina, precede al aumento de la permeabilidad de la membrana y se ha correlacionado negativamente con la movilidad de los espermatozoides (25).

Otro fenómeno que tiene cabida en la apoptosis es la **reducción del Potencial de Membrana Mitocondrial (MMP)**, antes de los cambios nucleares observados en muchas células apoptóticas (26). Las mitocondrias de los espermatozoides humanos son susceptibles a los estímulos de apoptosis debido a su compartimentalización dentro de la región de la pieza intermedia (27). Una membrana íntegra y un MMP intacto, es esencial para la movilidad de los espermatozoides y para una fecundación exitosa (28) (29), puesto que se ha hallado un MMP reducido con mayor frecuencia en los espermatozoides de hombres infértiles (30) (31). Por lo tanto, la alteración del MMP resulta un marcador clave de la cascada de señalización apoptótica y se observa en los espermatozoides humanos después de la crioconservación y descongelación (32).

Un tercer evento característico de la apoptosis es la **activación de las caspasas**, una familia de proteasas de cisteína (33). Estos enzimas participan en una cascada de señalización celular desencadenada en respuesta a señales pro-apoptóticas y que culmina con la proteólisis de las proteínas esenciales para la homeostasis de la célula y, en última instancia, resulta en la muerte celular (34). Se han encontrado 14 caspasas implicadas en la cascada apoptótica en humanos y su activación se produce por autoproteólisis y/o como resultado de las acciones de otras caspasas o proteínas reguladoras (33). Una vez activadas, transducen una señal a las caspasas efectoras que conduce a la degradación de sustratos celulares.

En la **apoptosis extrínseca** o de **tipo I**, la activación de caspasas tiene lugar a través del acoplamiento de ligandos a sus receptores específicos de membrana (35). Así, el ligando asociado a fibroblastos (*FasL*) es una proteína de transmembrana que tras la unión a su receptor, desencadena un programa intrínseco de muerte celular, lo que conduce a la activación de la Caspasa-8 (CP8) (36). Por su parte, esta caspasa puede iniciar la apoptosis activando directamente a la Caspasa-3 (CP3). Sin embargo, en la **apoptosis intrínseca** o de **tipo II**, las señales derivadas de la CP8 activan a la Caspasa-9 (CP9) a través de sucesos mitocondriales y ésta, a su vez, activa finalmente a la CP3, responsable última de la condensación de la cromatina y de la generación de roturas en el ADN (37) (Figura 2).

El receptor *Fas* se encuentra presente en las células germinales masculinas humanas, mientras que las células de Sertoli contienen tanto este receptor como su ligando (38). Este hecho sugiere que, al igual que en otros mamíferos, la liberación del ligando por las células de Sertoli por procesamiento proteolítico podría inducir la apoptosis de manera autocrina, es decir, directamente sobre las células de Sertoli, o paracrina, directamente sobre las células germinales (39). De esta forma, la evidencia apoya que en el componente celular del tejido testicular, las caspasas desempeñan un papel central en el proceso de apoptosis que conduce a la fragmentación del ADN de las células de Sertoli (40). Muestras de pacientes infértiles fueron caracterizadas por un alto

número de células con las caspasas activas, especialmente en los residuos citoplasmáticos, y mostraron una fuerte correlación con la externalización de la PS.

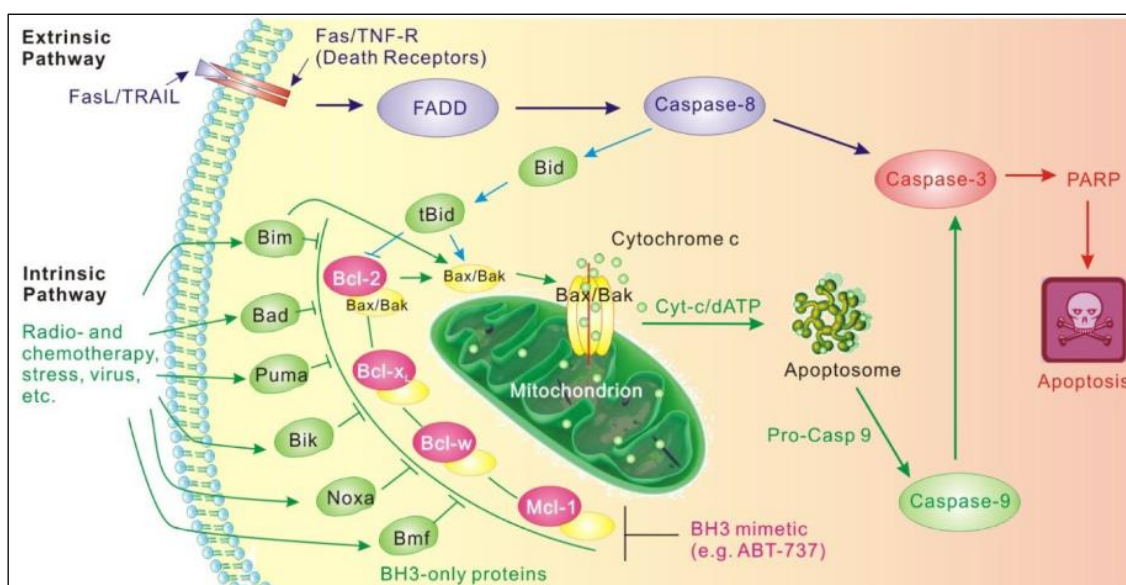


Figura 2. Cascada de apoptosis celular extrínseca e intrínseca. El proceso de apoptosis está controlado por numerosos eventos interconectados. La vía extrínseca es activada por señales externas como el ligando de *Fas* (*FasL*), que actúa a través de receptores de muerte. En consecuencia, la Caspasa-8 es activada y ejecuta, a su vez, la activación de la Caspasa-3. La vía intrínseca es iniciada por diferentes señales, principalmente por estímulos extracelulares. En esta vía, tras la activación de la Caspasa-8, la Caspasa-9 es activada a través de fenómenos mitocondriales, terminando en la activación de la Caspasa-3, principal efectora de la apoptosis (tomado de Bajwa y cols., 2012) (41).

La activación de estas enzimas ha aparecido implicada, no solamente en la alteración de la espermatogénesis, sino también en otras patologías andrológicas, tales como la disminución de la movilidad de los espermatozoides, fragmentación del ADN espermático, torsión testicular, varicocele o infertilidad inmunológica (37) (42). Este fenómeno se ha descrito como un punto de no retorno bien definido en la progresión de la apoptosis, y una serie de eventos apoptóticos posteriores a la activación de caspasas tiene lugar en la fase tardía del proceso.

La **fragmentación de ADN** se ha identificado como un evento de apoptosis tardía en espermatozoides de eyaculado humano (34) y ha ido adquiriendo cada vez mayor importancia en el éxito de la reproducción asistida. *Sakkas* y su grupo propusieron en 1999 (43) la teoría de la “apoptosis abortiva”, según la cual, algunos espermatozoides con daño en el ADN inician el mecanismo de apoptosis y posteriormente escapan del proceso, pudiendo ser la razón de encontrar en el eyaculado un mayor porcentaje de espermatozoides con su material genético dañado (44).

El daño en el ADN de los espermatozoides puede ser consecuencia de diversos factores, tales como la edad del varón, procesos infecciosos, exposición a xenobióticos o por defectos espermáticos (45). La introducción de un espermatozoide fecundante con su ADN dañado en un ovocito en el proceso de Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), conlleva un impacto negativo en la viabilidad del embrión y en la salud de la descendencia (46) (47). Esta situación puede tener lugar por un proceso defectuoso en la maquinaria de reparación del ADN dañado por parte del ovocito cuando es fecundado, resultando en mutaciones genéticas en el embrión. Otra explicación puede ser por la presencia de alteraciones en los patrones de metilación del ADN durante el proceso de gametogénesis (Figura 3).

Una revisión del año 2007 describe que el daño del ADN en la línea germinal masculina se asocia con bajas tasas de fecundación, pobre desarrollo embrionario, y altas tasas de aborto involuntario y morbilidad de la descendencia, incluyendo el cáncer infantil (45). Se ha garantizado el impacto negativo de la presencia de aneuploidías en los gametos masculinos sobre los resultados de FIV e ICSI (48) (49), por lo que se debe prestar especial atención a aquellos pacientes que exhiben este problema, concretamente cuando el tratamiento que se les ha de realizar es la microinyección de espermatozoides (47).

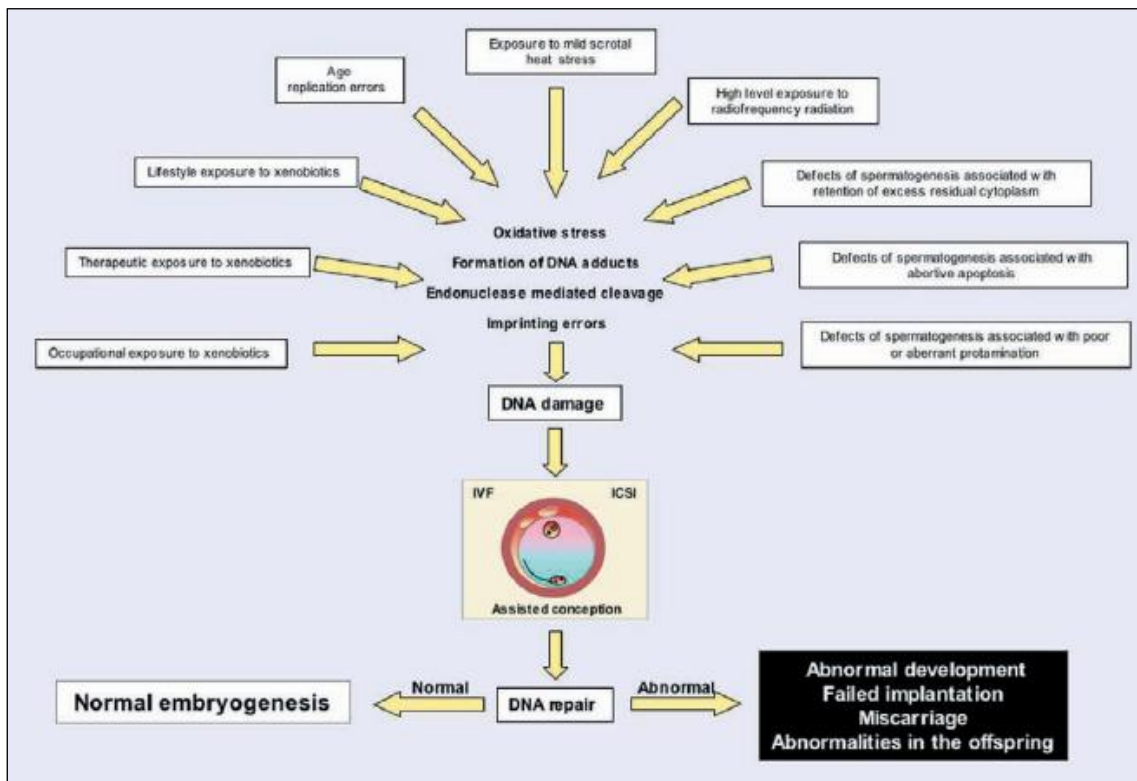


Figura 3. Factores implicados en la etiología del daño en el ADN de la línea germinal masculina (tomado de Aitken y De luliis, 2007) (45).

Todas estas características apoptóticas descritas se han identificado en espermatozoides del eyaculado, así como en las células germinales intratesticulares (44) (50). Estos datos sugieren que la apoptosis es un proceso subyacente en las células germinales durante la formación de los espermatozoides (51), es decir, la muerte celular programada es un fenómeno fisiológico necesario para la espermatogénesis normal en los mamíferos, con el fin de asegurar la homeostasis celular y mantener el equilibrio entre las células germinales y las células de Sertoli (16) (33).

Diversos daños a nivel testicular, incluyendo el calor, la exposición a compuestos tóxicos, la radiación, procesos de congelación y descongelación o un déficit hormonal, han mostrado contribuir en el proceso de apoptosis (40). En el testículo humano, la apoptosis parece ser el resultado final de varias patologías, tanto testiculares como

sistémicas (52). En el epidídimo, la apoptosis puede ser consecuencia de señales liberadas por espermatozoides anormales y/o senescentes o por los leucocitos, responsables de la producción de ROS, y otros mediadores de inflamación o infección. A nivel seminal, la muerte celular puede ser causada por la falta de antioxidantes u otros factores (42). Por todo ello, existe la posibilidad de que algunos espermatozoides seleccionados para TRA, muestren características apoptóticas a pesar de presentar parámetros seminales comprendidos dentro de los valores de normalidad, y esto puede aparecer reflejado en bajas tasas de embarazo, pobre desarrollo embrionario y aborto recurrente (53) (54).

Estudios realizados tanto en animales (55) como en humanos (43), indican que la apoptosis juega un papel importante en la infertilidad masculina (56). Marcadores apoptóticos en espermatozoides humanos fueron detectados en niveles significativamente superiores en hombres infértiles y en aquellos con varicocele (34) (57) (58), y esto se ha relacionado directamente con el fracaso de la fecundación, tanto *in vivo* como *in vitro* (49) (54) (59) (60). Por tanto, el desarrollo de protocolos para el estudio y la selección de espermatozoides no apoptóticos, debe ser considerado en los procedimientos de rutina, en orden a mejorar las tasas de éxito de TRA.

1.3.- Estudio de apoptosis espermática

El estudio de la apoptosis está especialmente indicado en varones que sufren algún trastorno andrológico como varicocele, criptorquidia, edad avanzada (> 45 años), teratozoospermia severa, leucocitospermia, fumadores severos, con tratamiento de quimio o radioterapia, con intentos previos de reproducción asistida con fallos repetidos de fecundación o embriones de mala calidad, y casos de pérdidas gestacionales tempranas.

Hasta hace años, la **evaluación morfológica** ha sido el método más fiable para la identificación de células apoptóticas individuales. Sin embargo, este método es subjetivo y no proporciona información sobre la cinética del proceso.

Otros métodos, como la **medición de fragmentos de ADN**, son más cualitativos que cuantitativos, no ofrecen información cinética sobre el proceso de apoptosis, consumen mucho tiempo y carecen de especificidad celular (19).

Los ensayos basados en **citometría de flujo (FCM)** han sido ampliamente utilizados por su poder de discriminación y capacidad de análisis de muestras con gran exactitud y velocidad. Además, esta tecnología ofrece la medida simultánea de varias características biológicas de células individuales, así como el análisis automático de miles de células en cuestión de unos pocos segundos, proporcionando resultados estadísticamente fiables. El análisis cuantitativo por citometría de flujo del **daño en el ADN** es fácil de realizar y garantiza una estimación fiable del número de células apoptóticas. Sin embargo, este método no proporciona ninguna información sobre el número de células apoptóticas que se encuentran en la fase inicial del proceso (19).

Diversos estudios mostraron la posibilidad de detectar el fenómeno apoptótico en espermatozoides, basándose en la medición por FCM de la fluorescencia emitida por fluorocromos específicos (19) (20) (21) (30) (61). La translocación de la PS a la superficie celular externa no es una característica única de la apoptosis, sino que también se produce durante la necrosis celular. La diferencia entre ambas formas de muerte celular es que durante las etapas iniciales de la apoptosis, la membrana celular permanece intacta, mientras que en el mismo momento de la necrosis, la membrana pierde su integridad y se vuelve permeable (19). Por lo tanto, el análisis de la unión de la Anexina V a la PS de la superficie celular como indicativo de la apoptosis, tiene que ser realizado en combinación con una prueba de exclusión de colorante para establecer la integridad de la membrana celular y así poder discriminar entre células viables, apoptóticas y necróticas (20).

La exposición de la PS puede ser detectada mediante el acoplamiento de la molécula Anexina V al fluorocromo **Isotiocianato de fluoresceína (FITC)**. Este fluorocromo de unión covalente es capaz de emitir fluorescencia de color verde cuando

la unión entre la Anexina V y la PS tiene lugar. Como colorante de exclusión ampliamente utilizado en combinación con esta metodológica, es el **Ioduro de Propidio (IP)**, un fluorocromo de unión no covalente que emite fluorescencia de color rojo cuando es capaz de penetrar en las células que presentan una membrana degenerada, característico de células necróticas. Por lo tanto, el marcaje de unión FITC-Anexina V junto con la exclusión de IP (AN+/IP-), será indicativo de cambios en la membrana característicos de espermatozoides apoptóticos tempranos. Siguiendo el mismo razonamiento, aquella población de células negativas para ambos fluorocromos (AN-/IP-) corresponderá a los espermatozoides viables. Las células doblemente positivas (AN+/IP+) representarán la población de espermatozoides necróticos o muertos. En cuanto a la fracción AN-/IP+, corresponderá a los espermatozoides necróticos o a células caracterizadas por un alto grado de desorganización de la membrana, lo que podría impedir la unión de Anexina V, o bien a espermatozoides en la etapa tardía de la apoptosis (61). Sin embargo, la importancia de esta subpoblación necesita mayor investigación.

1.4.- Reducción de apoptosis espermática

Dada la importancia del estudio de la fragmentación del ADN espermático junto con marcadores de apoptosis celular, surge la necesidad de buscar estrategias que permitan reducir el alto porcentaje de espermatozoides apoptóticos con el fin de optimizar los resultados de ICSI.

La primera opción en el tratamiento del factor masculino con altos niveles de fragmentación de ADN espermático, es la realización de una **biopsia de testículo**, puesto que en el epidídimo es donde tiene lugar el mayor daño en el núcleo de los espermatozoides y la omisión del paso de los gametos por dicha vía, permite obtener una menor tasa de fragmentación de ADN espermático (62). Junto a esto, en los últimos años, también se ha propuesto el uso de **antioxidantes orales**, previo a la

microinyección espermática, para reducir los daños en el material genético de los gametos.

En búsqueda de un método no invasivo, distintos grupos de trabajo se han centrado en el empleo de la **separación celular magnética** con el fin de reducir el porcentaje de apoptosis espermática. Típicamente, la separación celular magnética emplea el uso de partículas magnéticas conjugadas a proteínas o anticuerpos que permiten etiquetar y separar las células de interés (63). Para ello, se han ido desarrollado muchos tipos de microperlas magnéticas y *nanobeads* a lo largo de los años. Esta técnica ofrece como ventajas la simplicidad de la operación, bajo costo y la especificidad y sensibilidad proporcionada por el uso de reactivos inmunoespecíficos.

La separación magnética dispone de múltiples aplicaciones en el campo de la reproducción masculina, basándose en distintos anticuerpos empleados. Inicialmente, las microperlas magnéticas fueron utilizadas para seleccionar y caracterizar espermatozoides que habían llevado a cabo la reacción acrosómica, así como su capacidad para penetrar ovocitos de hámster desnudos (64). Otra aplicación ha sido para aislar espermatozoides libres de anticuerpos en su superficie celular en aquellas muestras de varones que presentaban infertilidad autoinmune (65) o incluso la combinación de esta técnica con micropartículas anti-CD45 para eliminar leucocitos de las muestras seminales (66) (67).

El uso de Anexina V acoplada a pequeñas esferas metálicas, de aproximadamente 50 nm de diámetro, y recubiertas por un polímero biodegradable, ha sido empleado por diversos autores para separar espermatozoides apoptóticos (68) (69). Estas microperlas paramagnéticas conjugadas con Anexina pueden ser usadas para aislar células con externalización de PS y, por tanto, separar espermatozoides con apoptosis temprana cuando son expuestos a un campo magnético de alto poder en una columna. Este procedimiento de separación o filtrado molecular se denomina ***Magnetic-Activated Cell Sorting*** (MACS) o **Separación Magnética por Columnas de Anexina V** (63).

Según esta innovadora metodología, las células con externalización de PS (AN+) quedan retenidas en la columna, mientras que aquellas no apoptóticas (AN-) no se adhieren y pasan a través de la columna, siendo las seleccionadas para usar en TRA (69) (70) (71). Después de retirar la columna del campo magnético, las células con exposición de PS se pueden eludir, constituyendo la fracción AN+ (63).

Debido al pequeño tamaño de las partículas magnéticas empleadas en esta técnica, se requiere el uso de un potente campo magnético que permita retener las células marcadas. Un sistema particularmente exitoso y diseñado para generar este campo magnético sin afectar a la viabilidad y a la función óptima de las células, es el sistema **MiniMACS™**, desarrollado y comercializado por *Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Alemania)* (70) (Figura 4).

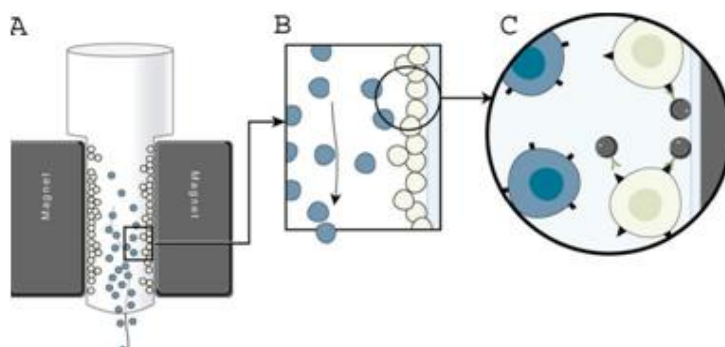


Figura 4. Esquema de una columna de separación celular magnética MiniMACS™. **A)** El campo magnético externo aplicado en las paredes de la columna atrae a las células marcadas magnéticamente mediante la unión de la PS, expuesta en la superficie de las células apoptóticas, y las moléculas de Anexina V acopladas a microesferas magnéticas. **B)** Las células no apoptóticas no quedan retenidas y pasan libremente a través de la columna. **C)** Las células apoptóticas quedan retenidas en el interior de la columna, pudiendo ser recuperadas tras desmontar la columna del campo magnético y posterior elución de la misma (tomado de Said y cols., 2008) (65).

Algunos autores señalan el beneficio de combinar las columnas de Anexina con la técnica clásica de los gradientes de densidad (72) (73) (74), con el fin de proporcionar a los espermatozoides una mejor calidad en cuanto a términos de movilidad, viabilidad y apoptosis (68), lo que resultaría importante para lograr unas tasas de concepción óptimas en las TRA (69) (72).

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La retención de espermatozoides con externalización de PS en las paredes imantadas de las columnas empleadas en MACS, redundará en un menor porcentaje de apoptosis en las muestras capacitadas tras haber sido filtradas, y ésta es la hipótesis en torno a la cual se desarrolla el presente trabajo.

Los objetivos que se persiguen son los siguientes:

- Analizar el fenómeno de apoptosis en esperma humano por citometría de flujo.
- Poner en práctica un método no invasivo por el que los espermatozoides apoptóticos (AN +) y no apoptóticos (AN -) sean separados, de forma que la fracción (AN -) pueda ser posteriormente utilizada para ICSI.
- Evaluar el efecto de MACS sobre el porcentaje de apoptosis de las muestras capacitadas antes y después de ser filtradas, con el fin de evaluar la eficacia de dicha técnica para su implementación en las TRA.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Población de estudio

Se trata de un análisis retrospectivo realizado con dos pacientes de la Clínica de Reproducción Asistida Quirón Bilbao en Agosto de 2013 y Marzo de 2014. Previo a cualquier evaluación y procesamiento de las muestras, se obtuvieron las serologías de los varones con el fin de descartar cualquier enfermedad de tipo infecciosa, y con un seminograma básico realizado fueron diagnosticados en consulta con indicación a ICSI.

3.2.- Muestras seminales

3.2.1.- Obtención de las muestras

Siguiendo las recomendaciones de la OMS 2010 y de la Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana en su manual de laboratorio, las muestras de semen fueron obtenidas mediante masturbación tras un período de 2 a 7 días de abstinencia sexual, en un bote estéril de propileno de boca ancha y entregadas el mismo día de la punción folicular, en el laboratorio de andrología en un tiempo inferior a 1 hora.

3.2.2.- Recogida de datos

Los sujetos firmaron un consentimiento informado, las muestras fueron identificadas con su nombre y apellidos y se recogieron los siguientes datos:

- Fecha y hora de recolección y de entrega de la muestras.
- Periodo de abstinencia sexual.
- Recogida completa o pérdida de alguna fracción del eyaculado.
- Procesos febriles y enfermedades/toma de medicación en los últimos 7-10 días.
- Incidencias (dolencia al eyacular, sangrado...).

3.3.- Evaluación de muestras seminales

Las muestras se dejaron licuar a temperatura ambiente durante un período aproximadamente de 20 minutos antes de realizar cualquier evaluación y procedimiento. La licuefacción se valoró mediante una simple observación visual de las muestras, comprobando que éstas estaban licuadas cuando presentaban un aspecto homogéneo, sin grumos ni coágulos. Si durante el tiempo descrito la licuefacción no tenía lugar, se pasaba el eyaculado por aguja de jeringa repetidas veces hasta conseguirlo.

Una vez licuadas las muestras, se midió el volumen de los eyaculados empleando recipientes graduados tipo *Falcon*. Para la evaluación de la concentración y movilidad espermática, se depositó una gota de 10 μ l de semen en la cámara *Makler* y se observó bajo el microscopio óptico (*Nikon Eclipse E200*) a 200X aumentos. La cámara *Makler* consta de una cuadrícula de 10 μ m de profundidad y con una superficie de 1 mm² subdividida en 100 cuadros (10 filas x 10 columnas) de 0,01 mm² cada uno. De este modo, la concentración de espermatozoides/ml en las muestras se obtuvo al multiplicar el resultado promedio de tres filas o columnas por el factor 10⁶/ml.

Para el análisis de la movilidad se realizó el recuento de 100 células y se obtuvieron los porcentajes de espermatozoides pertenecientes a cada una de las siguientes categorías establecidas por la OMS 2010:

- **Móviles progresivos (A + B):** espermatozoides moviéndose activamente, ya sea de forma lineal o en un círculo grande, independientemente de la velocidad.
- **Móviles no progresivos (C):** todos los otros patrones de movilidad con ausencia de progresión.
- **Inmóviles (D):** no hay movimiento.

3.4.- Gradientes de densidad

Se reservó una alícuota de semen fresco para posteriores procesos y el contenido restante fue procesado mediante gradientes de densidad discontinuos. Se prepararon los gradientes empleando 1 ml de la solución *Pure Ception (SAGE)* al 80% y 1 ml de la misma solución al 40%. Sobre dichos gradientes se depositó la muestra de semen fresco en un volumen variable (0,5-1 ml), según la calidad espermática que presentaba, siguiendo el mismo recorrido por la pared del tubo que las soluciones anteriores, con precaución de no romper los gradientes. Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos (*Centronic-BLII*) y los sedimentos o *pellet* celulares fueron aspirados mediante una pipeta, dejando expulsar una pequeña burbuja de aire antes de alcanzar el *pellet*, con el fin de asegurarse que la pipeta no contenía ningún resto procedente de las fases anteriores. Los *pellet* aspirados se depositaron en nuevos tubos con medio de lavado *QUINN'S Sperm Washing Medium (SAGE)*, se resuspendieron y se realizó una segunda centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron descartados dejando un volumen final de 500 µl para homogeneizar el *pellet* y se tomó una alícuota para analizar en la cámara *Makler* la concentración y movilidad del semen capacitado.

Resultó conveniente fraccionar las muestras en varios tubos, procesarlos siguiendo el protocolo y unificar el aspirado de cada tubo en un único recipiente con el fin de mejorar la tasa de recuperación de espermatozoides móviles.

3.5.- Ensayo de unión a Anexina V/ IP

3.5.1.- Preparación de las muestras

Se determinó el nivel de apoptosis de las muestras seminales destinadas a ICSI siguiendo diferentes protocolos de preparación según la concentración del semen capacitado. Las muestras fueron incubadas con los fluorocromos FITC

(fluorescencia verde) conjugado a Anexina V como marcador de apoptosis temprana, e IP (fluorescencia roja) como indicador de viabilidad celular.

Protocolo para concentraciones mayores de 1×10^6 espermatozoides/ml

Se preparó el diluyente 1X con agua estéril y *Annexin-V Binding Buffer 20X* y se realizó una dilución con 500 μ l de *buffer* y el volumen de semen necesario para obtener una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/ml.

Una vez diluidas las muestras, tanto de las alícuotas reservadas de semen fresco (“Tubo Fresco”) como de semen capacitado (“Tubo Capacitado”), se prepararon cuatro tubos (“Control Fresco”, “Fresco Marcado”, “Control Capacitado” y “Capacitado Marcado”) con 100 μ l de las muestras diluidas. El volumen restante de semen se guardó para posibles repeticiones del proceso. En los tubos “Control” se añadió 2 ml de *buffer*, mientras que en los tubos “Marcado” se adicionó 10 μ l de FITC-Anexina V y se dejaron incubar 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se añadió 2 ml de *buffer* y 21 μ l de IP (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de muestras seminales para citometría de flujo para concentraciones mayores de 1×10^6 espermatozoides/ml.

TUBO FRESCO (500 μ l <i>buffer</i> + V dilución)	Control Fresco (100 μ l)	2 ml <i>buffer</i> Analizar
	Fresco Marcado (100 μ l)	10 μ l FITC-Anexina V 15 min, T ^a ambiente, oscuridad 2 ml <i>buffer</i> + 21 μ l IP Analizar
TUBO CAPACITADO (500 μ l <i>buffer</i> + V dilución)	Control Capacitado (100 μ l)	2 ml <i>buffer</i> Analizar
	Capacitado Marcado (100 μ l)	10 μ l FITC-Anexina V 15 min, T ^a ambiente, oscuridad 2 ml <i>buffer</i> + 21 μ l IP Analizar

Protocolo para concentraciones menores de 1×10^6 espermatozoides/ml

Se prepararon dos tubos (“Tubo Fresco” y “Tubo Capacitado”) con 30 μ l de semen (fresco y capacitado respectivamente) y el mismo volumen de *buffer*. El contenido de ambos tubos fue repartido, a su vez, en otros dos recipientes, obteniendo un total de cuatro tubos con 30 μ l de muestra cada uno (“Control Fresco”, “Fresco Marcado”, “Control Capacitado” y “Capacitado Marcado”). Se añadió 1 ml de *buffer* en los tubos “Control”. En los tubos “Marcado” se añadió 3 μ l de FITC-Anexina V y se dejaron incubando 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se añadió 1ml de *buffer* y 10 μ l de IP (Tabla 4).

Tabla 4. Preparación de muestras seminales para citometría de flujo para concentraciones menores de 1×10^6 espermatozoides/ml.

TUBO FRESCO (30 μ l <i>buffer</i> + 30 μ l semen)	Control Fresco (30 μ l)	1ml <i>buffer</i> Analizar
	Fresco Marcado (30 μ l)	3 μ l FITC-Anexina V 15 min, T ^a ambiente, oscuridad 1ml <i>buffer</i> + 10 μ l IP Analizar
TUBO CAPACITADO (30 μ l <i>buffer</i> + 30 μ l semen)	Control Capacitado (30 μ l)	1ml <i>buffer</i> Analizar
	Capacitado Marcado (30 μ l)	3 μ l FITC-Anexina V 15 min, T ^a ambiente, oscuridad 1ml <i>buffer</i> + 10 μ l IP Analizar

3.5.2.- Detección de apoptosis espermática por citometría de flujo

El marcaje de los espermatozoides con FITC-Anexina V e IP fue medido con el citómetro de flujo *MACSQuant Analyzer* con un láser de argón de 488 nm.

Un mínimo de 10000 células fueron analizadas en un volumen de 50 µl de muestra.

La fluorescencia emitida por FITC fue recogida en el canal FL1 usando un filtro de paso de banda de 530/30 nm. La fluorescencia roja del IP fue recogida en el canal FL2 usando un filtro de paso de banda de 585/42 nm.

Tras el análisis de las muestras, se obtuvieron tres gráficos de puntos o *Dot Plot* para cada una. En el primero de ellos (FSC-A frente SSC-A) se dibujó una ventana en la región inferior izquierda rodeando la población de mayor concentración de espermatozoides. Los gráficos restantes aparecieron con los datos de la *gate* de la región seleccionada en el primero.

En el segundo gráfico (FITC-A frente IP) se ajustó la región del cuadrante inferior izquierdo (AN-/IP-) y en el tercero (FITC-A frente SSC-A) se ajustó el área izquierda (AN-), obteniendo el porcentaje final de espermatozoides apoptóticos (AN+) presentes en cada muestra. Cuando dicho porcentaje en las muestras capacitadas incubadas con Anexina V fue igual o superior al 15% de apoptosis, las muestras fueron filtradas mediante Columnas de Anexina.

3.6.- Separación de espermatozoides no apoptóticos mediante MACS

Los espermatozoides no apoptóticos fueron aislados por separación magnética utilizando *MACS® GMP Annexin V Kit (Miltenyi Biotec)* con los siguientes componentes: 0,5 ml *MACS® GMP Annexin V - Reagent*; 100 ml *MACS® GMP Annexin V Binding Buffer*; 5 MS Columns.

Se calculó el volumen de semen capacitado necesario para añadir a 500 µl de *MACS® GMP Annexin V Binding Buffer* para obtener una concentración final de $1,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml.

Las suspensiones fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos y los sobrenadantes fueron descartados. El *pellet* fue resuspendido en un volumen de 100 μ l de *MACS® GMP Annexin V – Reagent* y se añadió *MACS® GMP Annexin V Binding Buffer* hasta completar un volumen final de 500 μ l. Se homogeneizaron las muestras y se dejaron incubando 15-20 minutos en movimiento, a temperatura ambiente y en oscuridad. Cuando faltaban 5 minutos, se colocaron las columnas en el campo magnético y se equilibraron añadiendo 1 ml de *MACS® GMP Annexin V Binding Buffer*. Se esperó que eluyeran y las muestras fueron filtradas por las columnas y recogidos los productos filtrados (fracción AN-) en un tubo *Falcon*. Finalmente, las columnas fueron lavadas con 500 μ l de *MACS® GMP Annexin V Binding Buffer*.

Las fracciones AN- (células viables) fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos y descartados todos los sobrenadantes, dejando un volumen final de 500 μ l para resuspender el *pellet*. Se dejaron en la estufa 5 minutos, se comprobó la concentración y movilidad seminal bajo el microscopio óptico usando la cámara *Makler* y las muestras volvieron a analizarse por citometría.

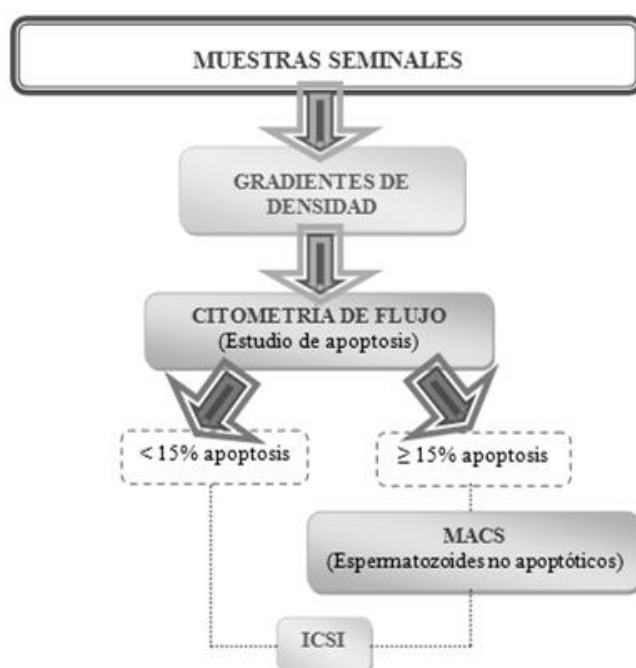


Figura 5. Esquema del procedimiento seguido.

4.- RESULTADOS

Paciente N° 1

El primer paciente presentó en el *Dot Plot* FITC-A frente IP de la muestra en fresco, 54,05% de fracción AN-/IP-; 13,49% de fracción AN+/IP-; 8,41% de fracción AN+/IP+ y 24,06% de fracción AN-/IP+ (Figura 6B). En el *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A de la misma muestra, el porcentaje total de espermatozoides viables (AN-) fue 77,71%, obteniéndose **22,68%** de espermatozoides en apoptosis temprana (AN+) (Figura 6C).

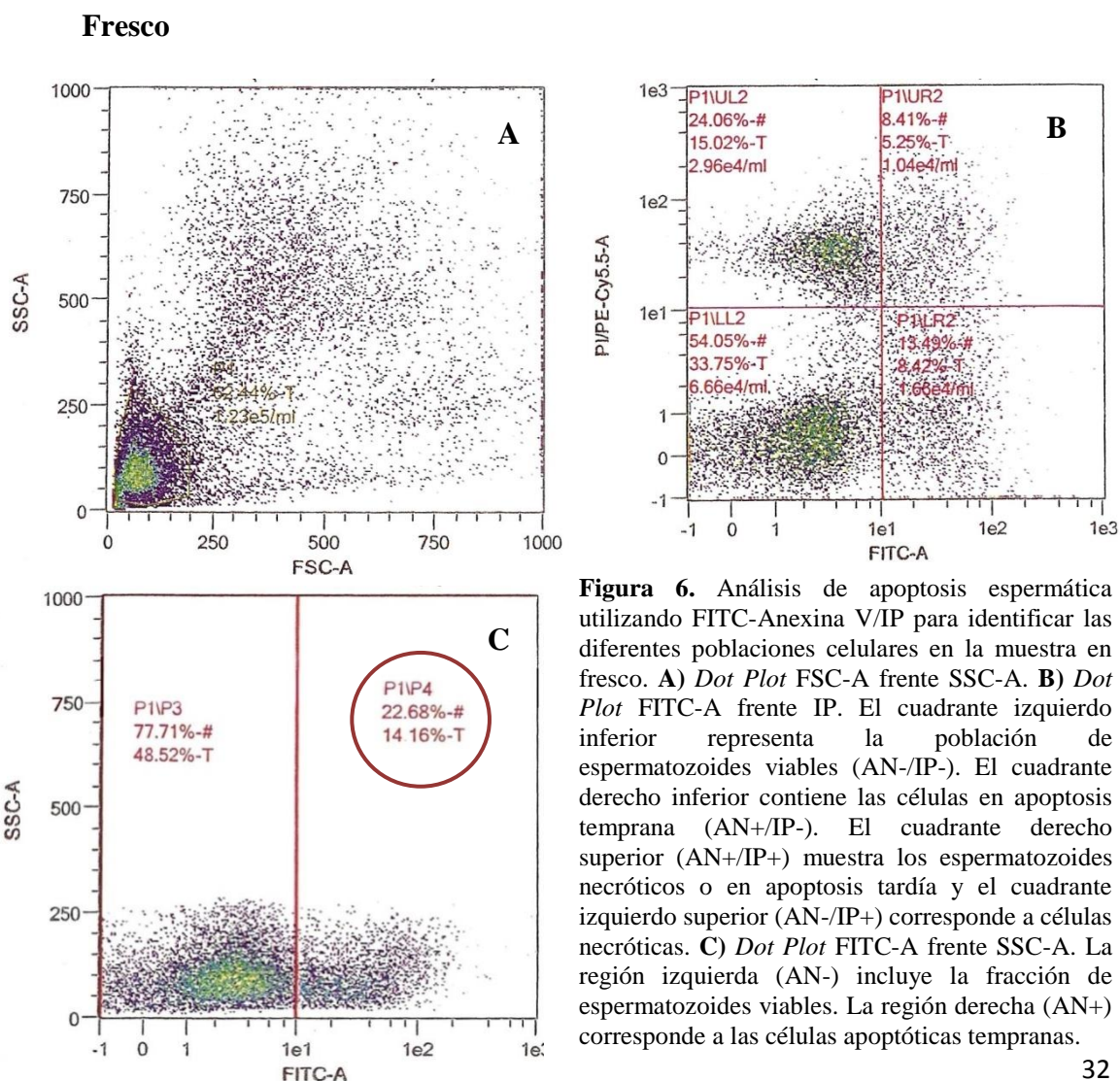


Figura 6. Análisis de apoptosis espermática utilizando FITC-Anexina V/IP para identificar las diferentes poblaciones celulares en la muestra en fresco. **A)** *Dot Plot* FSC-A frente SSC-A. **B)** *Dot Plot* FITC-A frente IP. El cuadrante izquierdo inferior representa la población de espermatozoides viables (AN-/IP-). El cuadrante derecho inferior contiene las células en apoptosis temprana (AN+/IP-). El cuadrante derecho superior (AN+/IP+) muestra los espermatozoides necróticos o en apoptosis tardía y el cuadrante izquierdo superior (AN-/IP+) corresponde a células necróticas. **C)** *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A. La región izquierda (AN-) incluye la fracción de espermatozoides viables. La región derecha (AN+) corresponde a las células apoptóticas tempranas.

En el *Dot Plot* FITC-A frente IP de la muestra capacitada, se observó 75,15% de fracción AN-/IP-; 7,63% de fracción AN+/IP-; 8,71% de fracción AN+/IP+ y 8,51% de fracción AN-/IP+ (Figura 7B). En el *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A de la misma muestra, el porcentaje total de espermatozoides viables (AN-) fue 83,66%, obteniéndose 16,17% de espermatozoides en apoptosis temprana (AN+) (Figura 7C).

Capacitado

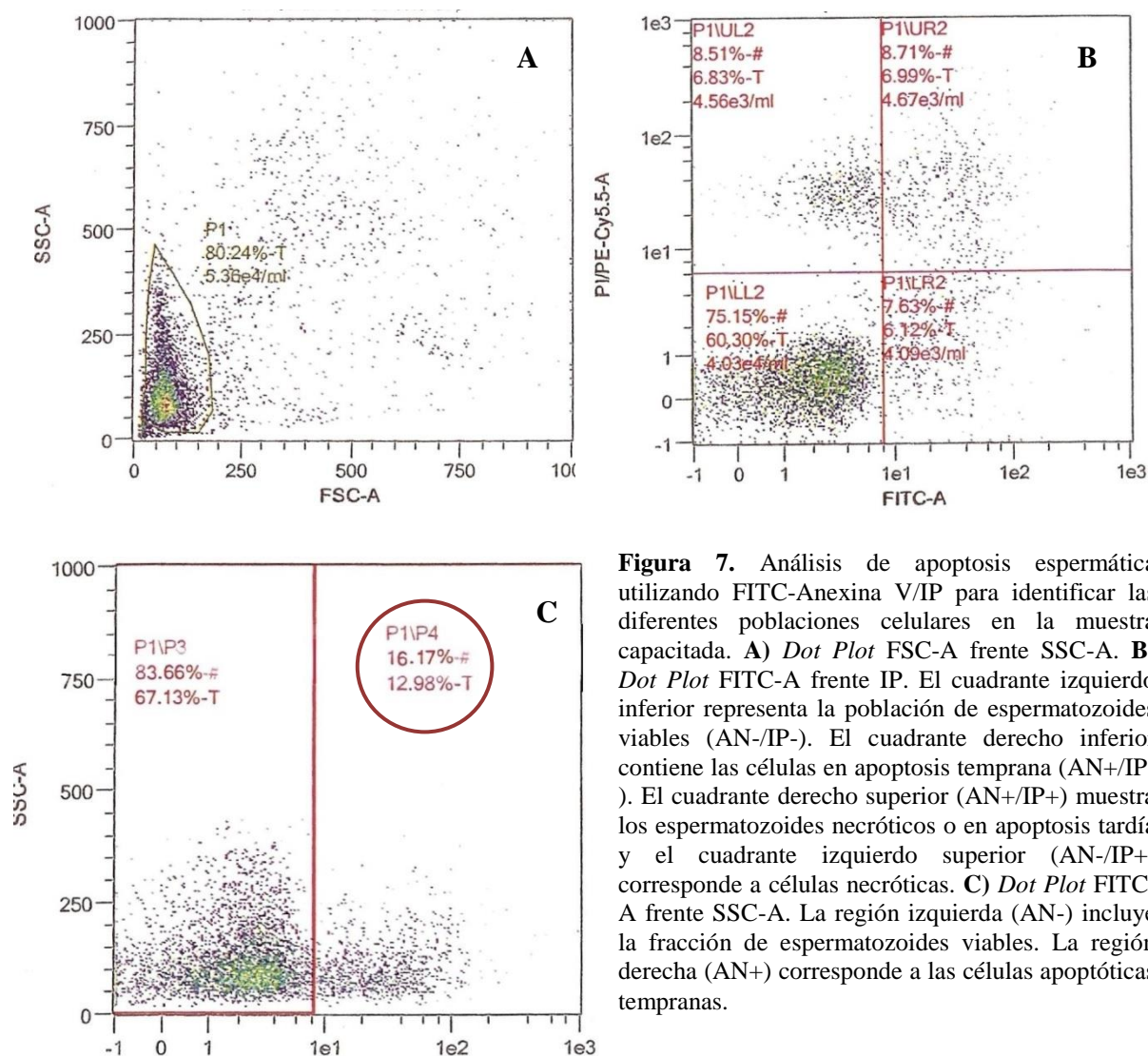


Figura 7. Análisis de apoptosis espermática utilizando FITC-Anexina V/IP para identificar las diferentes poblaciones celulares en la muestra capacitada. **A)** *Dot Plot* FSC-A frente SSC-A. **B)** *Dot Plot* FITC-A frente IP. El cuadrante izquierdo inferior representa la población de espermatozoides viables (AN-/IP-). El cuadrante derecho inferior contiene las células en apoptosis temprana (AN+/IP-). El cuadrante derecho superior (AN+/IP+) muestra los espermatozoides necróticos o en apoptosis tardía y el cuadrante izquierdo superior (AN-/IP+) corresponde a células necróticas. **C)** *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A. La región izquierda (AN-) incluye la fracción de espermatozoides viables. La región derecha (AN+) corresponde a las células apoptóticas tempranas.

En el *Dot Plot* FITC-A frente IP de la muestra filtrada por MACS, se obtuvo 87,54% de fracción AN-/IP-; 4,45% de fracción AN+/IP-; 2,37% de fracción AN+/IP+ y 5,64% de fracción AN-/IP+ (Figura 8B). En el *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A de la misma muestra, el porcentaje total de espermatozoides viables (AN-) fue 92,58%, obteniéndose 7,42% de espermatozoides en apoptosis temprana (AN+) (Figura 8C).

Post-MACS

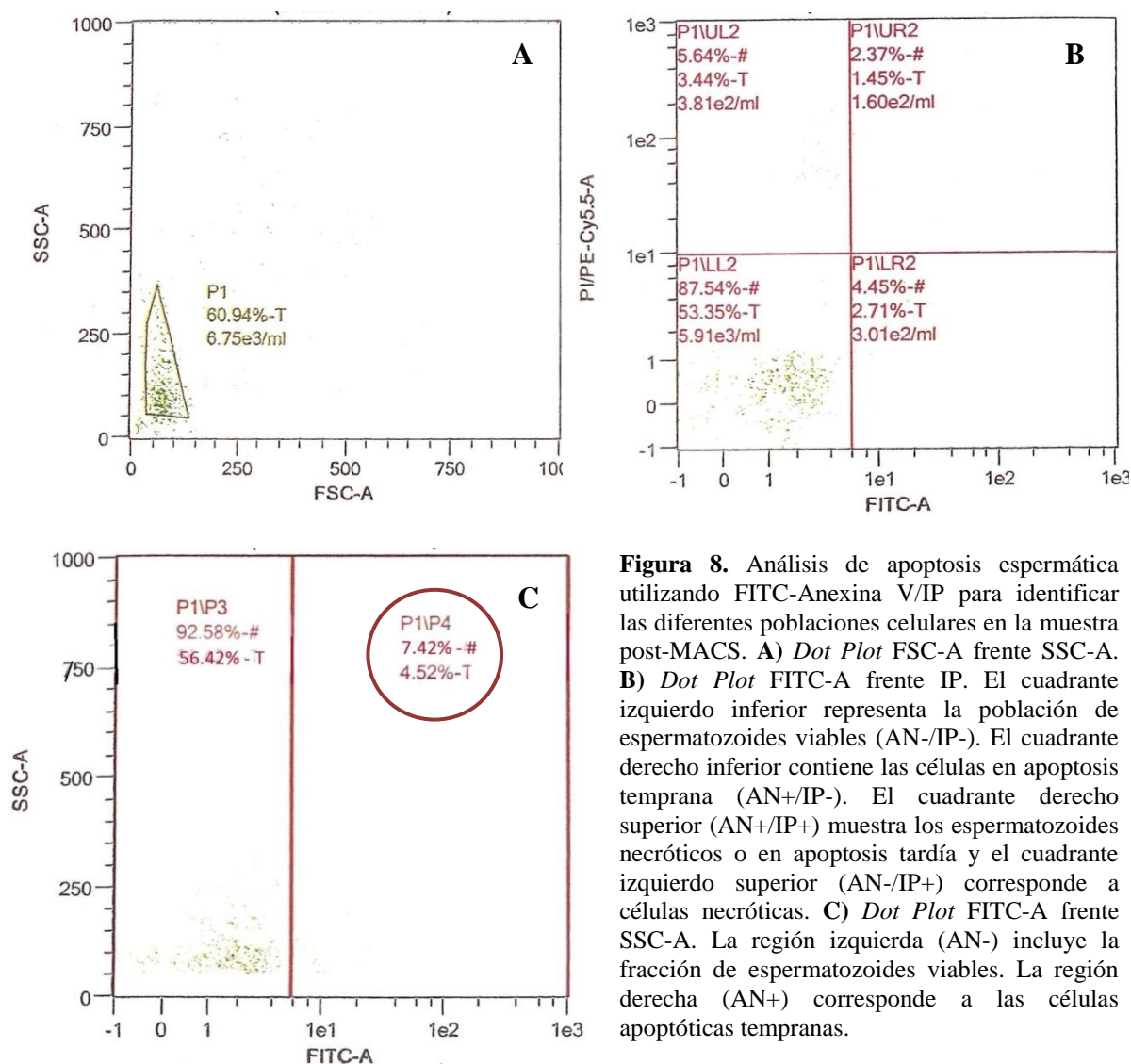


Figura 8. Análisis de apoptosis espermática utilizando FITC-Anexina V/IP para identificar las diferentes poblaciones celulares en la muestra post-MACS. **A)** *Dot Plot* FSC-A frente SSC-A. **B)** *Dot Plot* FITC-A frente IP. El cuadrante izquierdo inferior representa la población de espermatozoides viables (AN-/IP-). El cuadrante derecho inferior contiene las células en apoptosis temprana (AN+/IP-). El cuadrante derecho superior (AN+/IP+) muestra los espermatozoides necróticos o en apoptosis tardía y el cuadrante izquierdo superior (AN-/IP+) corresponde a células necróticas. **C)** *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A. La región izquierda (AN-) incluye la fracción de espermatozoides viables. La región derecha (AN+) corresponde a las células apoptóticas tempranas.

Paciente N° 2

El segundo paciente presentó en el *Dot Plot* FITC-A frente IP de la muestra en fresco, 70,97% de fracción AN-/IP-; 12,00% de fracción AN+/IP-; 14,95% de fracción AN+/IP+ y 2,08% de fracción AN-/IP+ (Figura 9B). En el *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A de la misma muestra, el porcentaje total de espermatozoides viables (AN-) fue 73,05%, obteniéndose **26,95%** de espermatozoides en apoptosis temprana (AN+) (Figura 9C).

Fresco

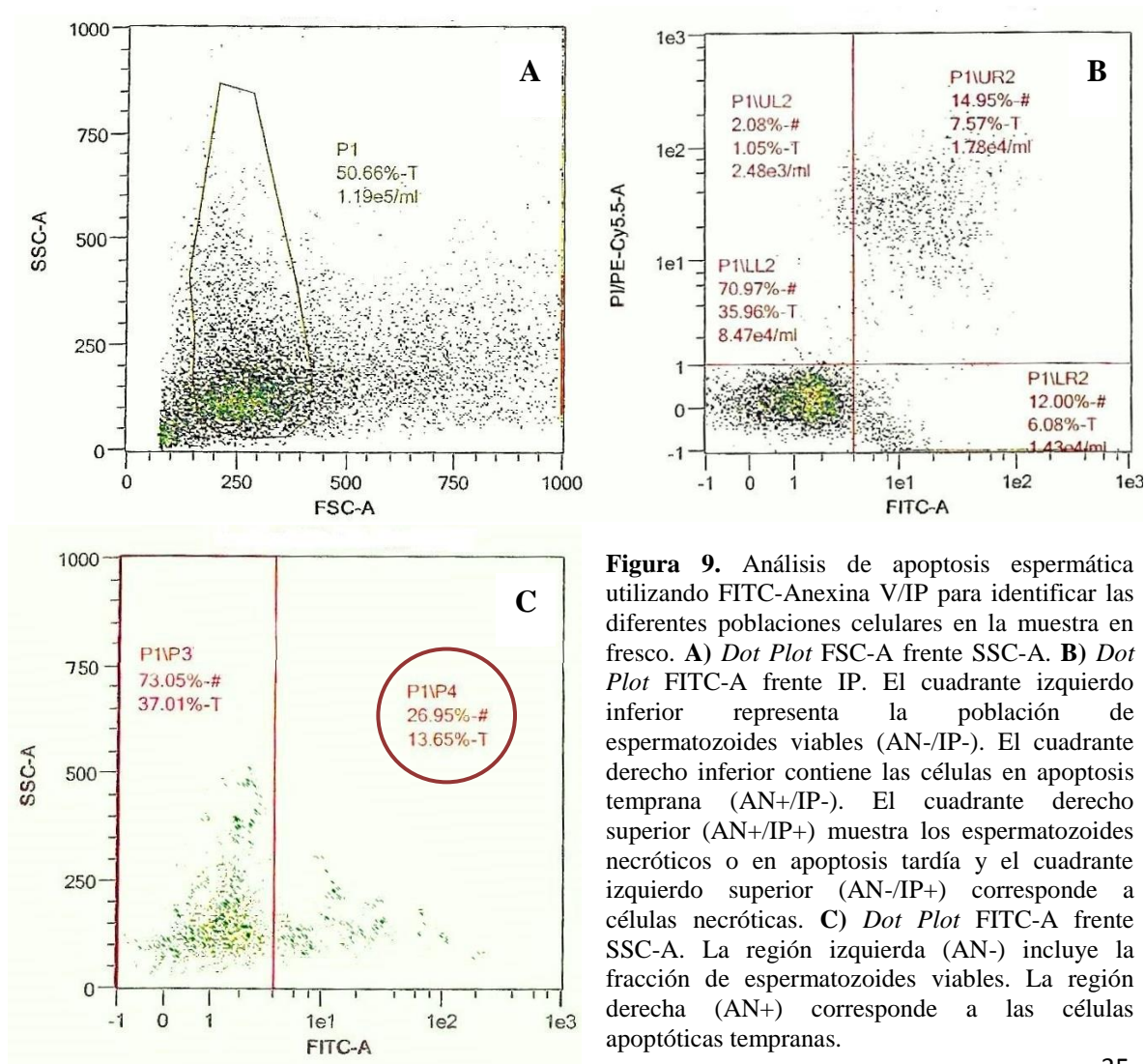


Figura 9. Análisis de apoptosis espermática utilizando FITC-Anexina V/IP para identificar las diferentes poblaciones celulares en la muestra en fresco. **A)** *Dot Plot* FSC-A frente SSC-A. **B)** *Dot Plot* FITC-A frente IP. El cuadrante izquierdo inferior representa la población de espermatozoides viables (AN-/IP-). El cuadrante derecho inferior contiene las células en apoptosis temprana (AN+/IP-). El cuadrante derecho superior (AN+/IP+) muestra los espermatozoides necróticos o en apoptosis tardía y el cuadrante izquierdo superior (AN-/IP+) corresponde a células necróticas. **C)** *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A. La región izquierda (AN-) incluye la fracción de espermatozoides viables. La región derecha (AN+) corresponde a las células apoptóticas tempranas.

En el *Dot Plot* FITC-A frente IP de la muestra capacitada, se observó 82,86% de fracción AN-/IP-; 9,49% de fracción AN+/IP-; 6,10% de fracción AN+/IP+ y 1,55% de fracción AN-/IP+ (Figura 10B). En el *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A de la misma muestra, el porcentaje total de espermatozoides viables (AN-) fue 84,41%, obteniéndose 15,59% de espermatozoides en apoptosis temprana (AN+) (Figura 10C).

Capacitado

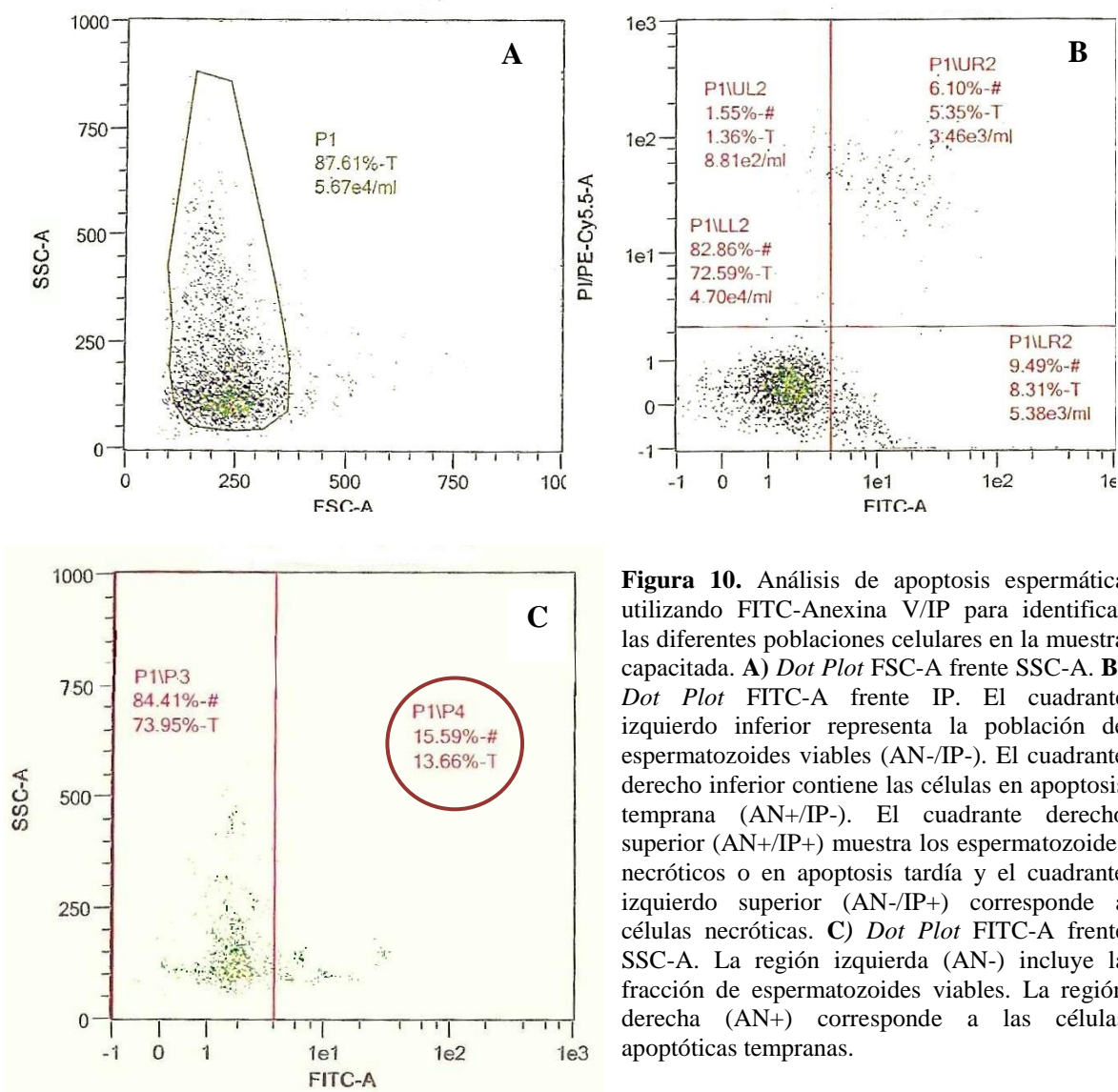


Figura 10. Análisis de apoptosis espermática utilizando FITC-Anexina V/IP para identificar las diferentes poblaciones celulares en la muestra capacitada. **A)** *Dot Plot* FSC-A frente SSC-A. **B)** *Dot Plot* FITC-A frente IP. El cuadrante izquierdo inferior representa la población de espermatozoides viables (AN-/IP-). El cuadrante derecho inferior contiene las células en apoptosis temprana (AN+/IP-). El cuadrante derecho superior (AN+/IP+) muestra los espermatozoides necróticos o en apoptosis tardía y el cuadrante izquierdo superior (AN-/IP+) corresponde a células necróticas. **C)** *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A. La región izquierda (AN-) incluye la fracción de espermatozoides viables. La región derecha (AN+) corresponde a las células apoptóticas tempranas.

En el *Dot Plot* FITC-A frente IP de la muestra filtrada por MACS, se obtuvo 83,07% de fracción AN-/IP-; 11,29% de fracción AN+/IP-; 3,48% de fracción AN+/IP+ y 2,16% de fracción AN-/IP+ (Figura 11B). En el *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A de la misma muestra, el porcentaje total de espermatozoides viables (AN-) fue 85,23%, obteniéndose 14,77% de espermatozoides en apoptosis temprana (AN+) (Figura 11C).

Post-MACS

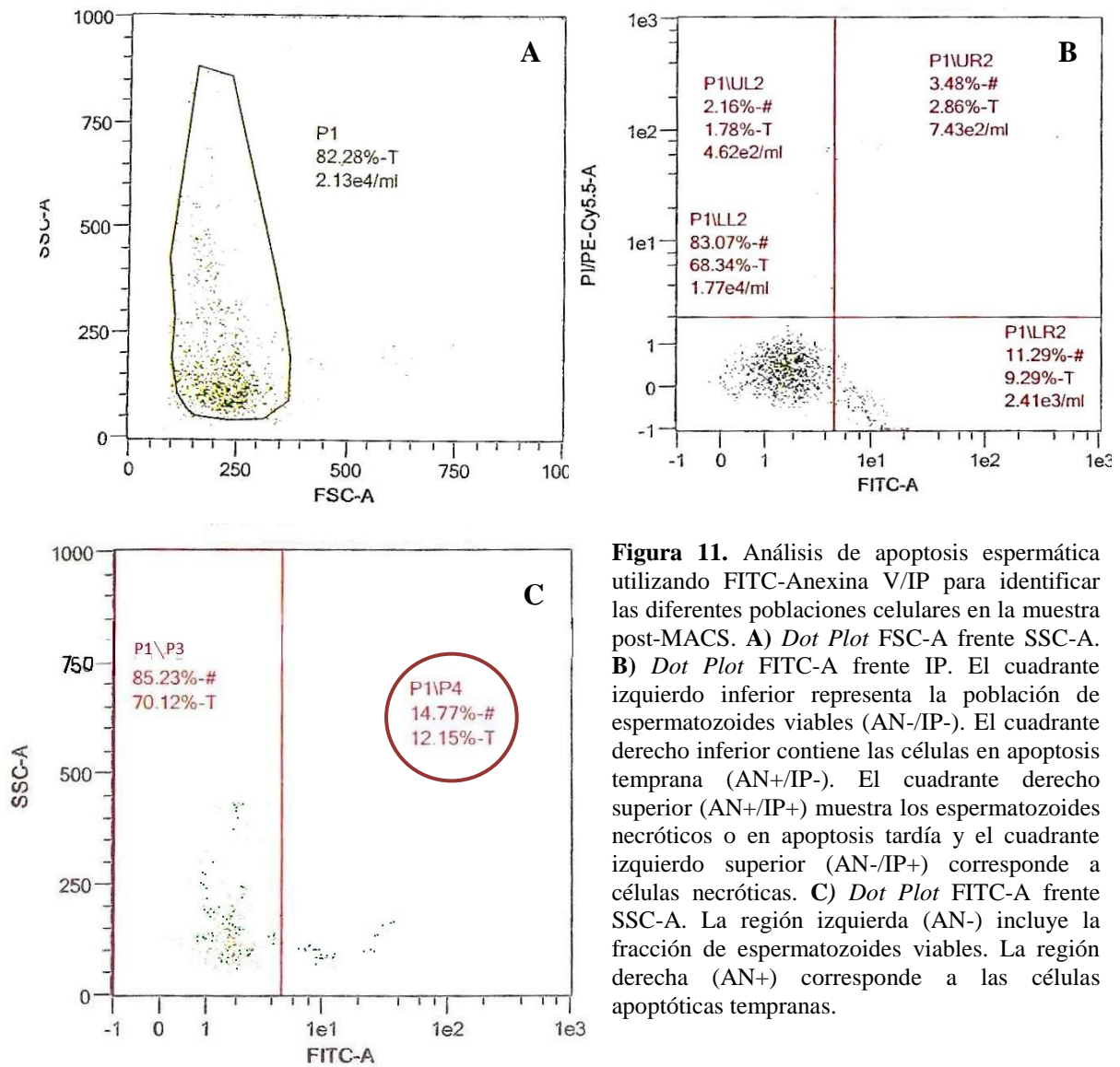


Figura 11. Análisis de apoptosis espermática utilizando FITC-Anexina V/IP para identificar las diferentes poblaciones celulares en la muestra post-MACS. **A)** *Dot Plot* FSC-A frente SSC-A. **B)** *Dot Plot* FITC-A frente IP. El cuadrante izquierdo inferior representa la población de espermatozoides viables (AN-/IP-). El cuadrante derecho inferior contiene las células en apoptosis temprana (AN+/IP-). El cuadrante derecho superior (AN+/IP+) muestra los espermatozoides necróticos o en apoptosis tardía y el cuadrante izquierdo superior (AN-/IP+) corresponde a células necróticas. **C)** *Dot Plot* FITC-A frente SSC-A. La región izquierda (AN-) incluye la fracción de espermatozoides viables. La región derecha (AN+) corresponde a las células apoptóticas tempranas.

Se calculó la media y la desviación estándar (SD) de los porcentajes de apoptosis espermática presentes en las muestras en fresco, capacitado y post-MACS (Tabla 5). Los resultados obtenidos aparecen representados en la Figura 12.

Tabla 5. Niveles de apoptosis espermática en las diferentes muestras analizadas.

Apoptosis espermática (%)	
Muestra	media \pm SD
Fresco	24,82 \pm 3,02
Capacitado	15,88 \pm 0,41
Post-MACS	11,10 \pm 5,20

SD: desviación estándar.

Las muestras de semen fresco mostraron 24,82% \pm 3,02% de apoptosis espermática. El nivel de apoptosis obtenido en las muestras capacitadas fue 15,88% \pm 0,41% y 11,10% \pm 5,20% tras la filtración en columnas.

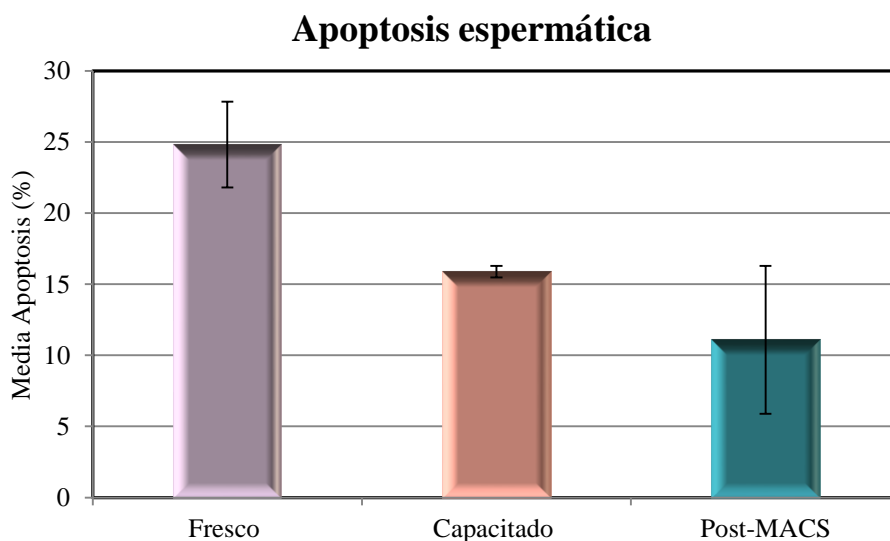


Figura 12. Representación gráfica del porcentaje de apoptosis espermática presente en los tres tipos de muestra. Se representa la media y su desviación estándar.

5.- DISCUSIÓN

En los últimos años, la calidad seminal ha pasado a considerarse uno de los factores determinantes del éxito en TRA (4). Las metodologías empleadas de forma rutinaria por las unidades de reproducción asistida se basan fundamentalmente en el análisis de los parámetros seminales, especialmente a nivel de concentración, movilidad y morfología, así como en la separación de los espermatozoides que presentan mayor movilidad. A pesar de que estas técnicas convencionales proporcionan importante información sobre las características del eyaculado y resultan en la selección de un número suficiente de espermatozoides móviles, no permiten la evaluación de fenómenos moleculares como la apoptosis espermática.

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo fisiológico que hace referencia al conjunto de alteraciones celulares morfológicas y bioquímicas que suponen la muerte de la célula (12) y que ha sido identificado tanto en espermatozoides humanos como en las células germinales intratesticulares (44) (50). Este hecho sugiere que la apoptosis es un mecanismo subyacente del proceso de espermatogénesis (51) con el objeto de asegurar la homeostasis celular y mantener un equilibrio entre las células germinales masculinas y las células de Sertoli (16) (33). Por ello, existe la posibilidad de que algunos espermatozoides seleccionados para TRA muestren características apoptóticas a pesar de presentar parámetros seminales comprendidos dentro de los valores de normalidad, y esto puede aparecer reflejado en bajas tasas de embarazo, pobre desarrollo embrionario y aborto recurrente (53) (54).

Con deseo a mejorar las tasas de éxito de TRA, se ha prestado especial atención a la búsqueda y aplicación de nuevos protocolos complementarios a las técnicas convencionales de evaluación y preparación de muestras seminales, que permitan el estudio y la selección de espermatozoides no apoptóticos.

Los ensayos basados en citometría de flujo han sido ampliamente utilizados por su gran exactitud, poder de discriminación y velocidad de análisis. La combinación del uso de Anexina V conjugada al fluorocromo FITC, junto con la prueba de exclusión del colorante IP, permite la discriminación entre células viables (AN-/IP-), apoptóticas (AN+/IP-) y necróticas (AN+/IP+) (AN-/IP+) (20).

Estudios realizados con FCM relatan una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides AN-/PI- con los parámetros del semen convencional y el MMP, pero una correlación negativa con la fragmentación del ADN (25). Esta población de células muestra una calidad superior en términos de alta movilidad, baja activación de caspasas, alto MMP y poca fragmentación del ADN (68) (75), lo que lleva a postular que los espermatozoides AN-/PI- representan esperma de alta calidad con el fin de servir como un indicador objetivo para la fertilidad potencial de un individuo.

En cuanto a la población de espermatozoides apoptóticos tempranos (AN+/IP-) existen controversias sobre la correlación existente entre dichas células y la movilidad espermática. Así, *Glander y J. Schaller* (30) detectaron una correlación positiva, en contraposición a lo encontrado posteriormente por otros autores (20) (25) (68). Con respecto a la relación entre los cambios apoptóticos y la concentración espermática, también existen controversias. Diferentes estudios demostraron una correlación negativa entre la cantidad de espermatozoides AN+/IP- o con ADN fragmentado y la concentración de espermatozoides (20) (25). Esto significa que la baja concentración de espermatozoides puede ser debida a una alta tasa de apoptosis, en contraste a lo observado por *Shen* y su grupo (76).

Se ha comprobado también que el porcentaje de espermatozoides AN+/IP- no se encuentra correlacionado con el porcentaje de espermatozoides que presentan fragmentación de ADN (20). Este hallazgo puede explicarse por el hecho de que la externalización de PS y la presencia de daños en el ADN tienen lugar durante diferentes fases del proceso de apoptosis. Sin embargo, una correlación positiva entre este

fenómeno y los espermatozoides apoptóticos tardíos (AN+/IP+) ha sido hallada (25), lo que confirma que la fragmentación de ADN es un fenómeno apoptótico tardío. Estas correlaciones sugieren también que los espermatozoides AN+/PI+ son más propensos a ser células apoptóticas tardías que células necróticas.

En otros estudios, se ha descrito una correlación positiva entre la fragmentación del ADN espermático y la activación de caspasas (34), y este hecho fue confirmado en semen de baja movilidad (77). También se ha demostrado una fuerte correlación entre los niveles de fragmentación del ADN y el MMP en espermatozoides humanos (78). En este contexto, correlaciones negativas entre el MMP y la movilidad espermática han sido reportadas por numerosos trabajos (25) (79) (80), y correlaciones positivas entre la concentración y morfología de los espermatozoides (25) (79) (81). La correlación negativa existente entre el MMP y el porcentaje de fragmentación de ADN (25) implica fuertemente una asociación entre la infertilidad masculina y las alteraciones mitocondriales observadas durante la apoptosis.

Adicionalmente, otros autores han mostrado una correlación positiva entre la edad de los pacientes y el porcentaje de espermatozoides apoptóticos (AN+/IP-) y una relación negativa con los espermatozoides viables (AN-/IP-) (61).

Estas controversias pueden ser resultado de las diferencias en los métodos empleados y/o de la población de pacientes estudiados. Sin embargo, todos estos resultados obtenidos apuntan a la teoría de la “apoptosis abortiva” según Sakkas y su grupo, que tiene lugar en muchos hombres cuyos parámetros seminales se sitúan por debajo de la normalidad. Por todo ello, es de notable importancia la separación de espermatozoides no apoptóticos en las muestras seminales empleadas en TRA.

Diferentes estrategias se han descrito para reducir el alto porcentaje de espermatozoides apoptóticos. Autores como Greco y su grupo postularon en el año 2005 que el tratamiento con antioxidantes orales, previo a la realización de ICSI, no mejoraba las tasas de fecundación ni división embrionaria, pero sí se observaba un

aumento en las tasas de implantación y embarazo **(82) (83)**. Por otro lado, otros autores afirmaron que el uso de antioxidantes no mejoraba los resultados del tratamiento de ICSI de manera significativa **(84)**.

Otra alternativa es la práctica de biopsia testicular, donde los estudios realizados no han encontrado diferencias en la tasa de fecundación o calidad embrionaria. Sin embargo, el número de embarazos utilizando espermatozoides de testículo ha sido superior a los conseguidos con espermatozoides de eyaculado que presentaban altos niveles de daño en el ADN.

El empleo basado en la Separación Magnética por Columnas de Anexina o MACS, ha resultado de gran atractivo y utilidad en este campo por la ausencia de invasividad. Esta metodología se basa en la incubación de las muestras seminales con moléculas de Anexina V conjugadas a microesferas paramagnéticas y posterior filtración por las paredes imantadas de las columnas. El resultado final es la retención en la columna de la población de espermatozoides con externalización de PS y la recuperación de los gametos no apoptóticos que atraviesan la columna libremente y que serán los empleados en TRA **(34) (69) (70) (71)**.

Un estudio realizado por *Dirican* y su grupo en el año 2008 **(63)** reportó un aumento en las tasas de embarazo y de división embrionaria en pacientes oligoastenozoospermicos utilizando la microinyección de espermatozoides humanos no apoptóticos seleccionados por MACS. Estos mismos autores, junto con otros estudios, demostraron que la fracción de espermatozoides AN- separada por MACS, presentaba un porcentaje significativamente menor de fragmentación de ADN con respecto a la población AN+ **(63) (85)**. El producto filtrado por Columnas de Anexina reveló también en otros trabajos una mejor morfología seminal **(63) (69) (73) (85)** y un mayor porcentaje de espermatozoides con cromatina descondensada tras la realización de ICSI **(63) (68) (86)**.

Algunos autores han patentado el beneficio de combinar MACS con DGC en cuanto a la obtención de espermatozoides con mejores parámetros seminales y menores niveles de apoptosis **(68) (72) (73) (74)**. Es por ello que el presente trabajo se desarrolló analizando el fenómeno de apoptosis espermática haciendo uso de la tecnología FCM y posterior filtración de las muestras por MACS para la separación de espermatozoides no apoptóticos, tras la evaluación rutinaria y la capacitación espermática mediante DGC.

Los resultados obtenidos en el primer paciente mostraron una reducción notable de los niveles de apoptosis espermática, pasando de 22,68% (muestra en fresco) y 16,17% (muestra capacitada), a 7,42% (muestra post-MACS) tras la separación magnética de espermatozoides no apoptóticos en el semen capacitado. En el segundo paciente, la reducción de los niveles apoptóticos fue más sutil, presentando un porcentaje de apoptosis inicial de 26,95% (muestra en fresco) y 15,59% (muestra capacitada) y convirtiéndose en un valor final de 14,77% (muestra post-MACS) tras la filtración en las columnas.

A pesar del pequeño tamaño muestral de este trabajo, los resultados corroboran los obtenidos por otros autores, en tanto a reducción de espermatozoides con marcadores apoptóticos **(37) (68) (69) (71) (72) (74) (85) (87)**. Además, en los dos pacientes analizados, se pudo observar una mejoría en los niveles de apoptosis tras la capacitación espermática con respecto a las muestras en fresco. Este hecho puede explicarse por la eliminación de gametos muertos que tiene lugar durante el proceso de capacitación espermática. Cuando las muestras capacitadas fueron, además, filtradas por MACS, el porcentaje de apoptosis todavía se vio más reducido y estos resultados coinciden con los encontrados en el trabajo realizado por *Tavalaee* y su grupo **(73)**, los cuales demostraron una mayor calidad espermática empleando la combinación DGC-MACS que aplicando dichas técnicas por separado.

La bibliografía, hasta fecha de hoy, coincide en que la separación magnética de espermatozoides apoptóticos mediante el empleo de moléculas de Anexina V, mejora las tasas de embarazo (88) y como prueba de ello, pueden mencionarse los nacimientos conseguidos mediante la aplicación de esta tecnología previa a la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (85) (89) (90). Sin embargo, esta tecnología es considerada todavía novedosa, por lo que se requieren estudios prospectivos aleatorizados realizados con mayor profundidad, con objeto a determinar el efecto del uso de MACS sobre la viabilidad de los futuros embriones, antes de ser implementada en las unidades de reproducción asistida.

6.- CONCLUSIONES

La elucidación de los mecanismos responsables de la apoptosis celular y sus consecuencias derivadas sobre la funcionalidad de los espermatozoides del eyaculado, supone una contribución significativa en el campo de la reproducción humana, permitiendo desarrollar indicadores de diagnóstico más definidos y nuevas terapias o estrategias de prevención de la infertilidad masculina.

El uso de FCM para medir la apoptosis en las muestras espermáticas, es un enfoque novedoso y fiable que posibilita el estudio de la viabilidad funcional de los gametos masculinos.

La Separación Magnética por Columnas de Anexina resulta en un sistema simple, flexible y rápido para la separación de espermatozoides no apoptóticos de acuerdo a marcadores específicos de la superficie celular.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la aplicación de Columnas de Anexina tras la realización de DGC, permite reducir el porcentaje de apoptosis en las muestras seminales capacitadas. Por lo tanto, la implementación y ejecución de la determinación de la apoptosis por FCM y la posterior filtración de las muestras seminales mediante MACS, permitiría obtener una población de espermatozoides no apoptóticos y convertirse en una herramienta complementaria a los métodos de rutina muy eficaz para la evaluación del factor masculino, en orden a mejorar las tasas de éxito de TRA.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertil Steril* 2009;92(5):1520-1524.
2. Brookings C, Goldmeier D, Sadeghi-Nejad H. Sexually transmitted infections and sexual function in relation to male fertility. *Korean J Urol* 2013;54(3):149-156.
3. Ferraretti AP, Goossens V, Kupka M, Bhattacharya S, Mouzon J de, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2013;det278.
4. 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):485-492.
5. Henkel RR, Schill W-B. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:108.
6. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition.
7. Cooper TG, Noonan E, Eckardstein S von, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010;16(3):231-245.
8. Youn JS, Cha SH, Park CW, Yang KM, Kim JY, Koong MK, et al. Predictive value of sperm motility characteristics assessed by computer-assisted sperm analysis in intrauterine insemination with superovulation in couples with unexplained infertility. *Clin Exp Reprod Med* 2011;38(1):47-52.
9. Jameel T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. *J Pak Med Assoc* 2008;58(2):71-74.
10. Mortimer D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1991;6(2):173-176.
11. Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009;91(4):1077-1084.
12. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-257.
13. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* 1997;88(3):347-354.
14. Hannun YA. Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy. *Blood* 1997;89(6):1845-1853.
15. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336(16):1131-1141.

16. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999;4(1):38.
17. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that Spur Autophagy and Immunity. *Immunol Rev* 2012;249(1):158-175.
18. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995;9(13):1277-1287.
19. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184(1):39-51.
20. Oosterhuis GJE, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000;74(2):245-250.
21. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15(6):1338-1344.
22. Van Heerde WL, de Groot PG, Reutelingsperger CP. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb Haemost* 1995;73(2):172-179.
23. Reutelingsperger CPM, Hornstra G, Hemker HC. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem* 1985;151(3):625-629.
24. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000;243(1-2):167-190.
25. Zhang H-B, Lu S-M, Ma C-Y, Wang L, Li X, Chen Z-J. Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl* 2008;10(2):227-235.
26. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997;18(1):44-51.
27. Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander H-J, Agarwal A. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril* 2005;83(Suppl 1):1106-1112.
28. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem* 1982;30(3):279-280.
29. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Rev Biomembr* 2000;1469(3):197-235.
30. Glander H-J, J.Schaller. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999;5(2):109-115.

31. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-Thawing of Fractionated Human Spermatozoa Is Associated With Membrane Phosphatidylserine Externalization and Not DNA Fragmentation. *J Androl* 2001;22(4):646-651.
32. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2002;17(3):704-709.
33. Said TM, Paasch U, Glander H-J, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 2004;10(1):39-51.
34. Weng S-L, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8(11):984-991.
35. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254(3):439-459.
36. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267(5203):1449-1456.
37. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander H-J. Deterioration of Plasma Membrane Is Associated With Activated Caspases in Human Spermatozoa. *J Androl* 2003;24(2):246-252.
38. Francavilla S, D'Abrazio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, et al. Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(8):2692-2700.
39. Kierszenbaum AL. Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive. *Mol Reprod Dev* 2001;58(1):1-3.
40. Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, et al. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 2002;17(7):1811-1819.
41. Bajwa N, Liao C, Nikolovska-Coleska Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2012;22(1):37-55.
42. Oehninger S, Morshedi M, Weng S-L, Taylor S, Duran H, Beebe S. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod BioMed Online* 2003;7(4):469-476.
43. Sakkas D, Mariethoz E, St. John JC. Abnormal Sperm Parameters in Humans Are Indicative of an Abortive Apoptotic Mechanism Linked to the Fas-Mediated Pathway. *Exp Cell Res* 1999;251(2):350-355.
44. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA Damage in Ejaculated Human Spermatozoa and the Possible Involvement of Apoptosis. *Biol Reprod* 2002;66(4):1061-1067.
45. Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod BioMed Online* 2007;14(6):727-733.
46. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005;11(4):337-349.

47. Aitken RJ. The Amoroso Lecture The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999;115(1):1-7.
48. Nicopoullos JDM, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Nice L, Tempest H, et al. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod* 2008;23(2):240-250.
49. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;82(2):378-383.
50. Vorup-Jensen T, Hjort T, Abraham-Peskir JV, Guttmann P, Jensenius JC, Uggerhøj E, et al. X-ray microscopy of human spermatozoa shows change of mitochondrial morphology after capacitation. *Hum Reprod* 1999;14(4):880-884.
51. Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(1):152-156.
52. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15(4):830-839.
53. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, et al. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2003;101(6):1229-1235.
54. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, et al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004;81(4):965-972.
55. Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ. Effects of Hyperthermia on Spermatogenesis, Apoptosis, Gene Expression, and Fertility in Adult Male Mice. *Biol Reprod* 2001;65(1):229-239.
56. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004;19(1):129-138.
57. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an Image Analysis System to Monitor the Retention of Residual Cytoplasm by Human Spermatozoa: Correlation With Biochemical Markers of the Cytoplasmic Space, Oxidative Stress, and Sperm Function. *J Androl* 1996;17(3):276-287.
58. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001;16(10):2160-2165.
59. Høst E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79(7):559-563.
60. Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gaviño F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 2006;85(1):149-154.

61. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod* 2002;17(10):2665-2672.
62. Ramos L, de Boer P, Meuleman EJH, Braat DDM, Wetzels AMM. Chromatin condensation and DNA damage of human epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Reprod Biomed Online* 2004;8(4):392-397.
63. Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Ak?n KO, Ercan O, Ugurlu M, et al. 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):375-381.
64. Moutaffian H, Parinaud J. Selection and characterization of human acrosome reacted spermatozoa. *Hum Reprod* 1995;10(11):2948-2951.
65. Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander H-J, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008;29(2):134-142.
66. Hipler UC, Schreiber G, Wollina U. Reactive oxygen species in human semen: investigations and measurements. *Arch Androl* 1998;40(1):67-78.
67. Krausz C, West K, Buckingham D, Aitken RJ. Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leukocytes. *Fertil Steril* 1992;57(6):1317-1325.
68. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006;74(3):530-537.
69. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander H-J, Baumann T, Kriegel C, et al. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online* 2005;10(6):740-746.
70. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11(2):231-238.
71. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera H-J. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004;81(Suppl 1):802-809.
72. Lee T-H, Liu C-H, Shih Y-T, Tsao H-M, Huang C-C, Chen H-H, et al. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod* 2010;25(4):839-846.
73. Tavalae M, Deemeh MR, Arbabian M, Nasr-Esfahani MH. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 2012;29(1):31-38.
74. De Vantéry Arrighi C, Lucas H, Chardonnens D, de Agostini A. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:1.
75. Paasch U, Grunewald S, Wuendrich K, Jope T, Glander H-J. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian J Androl* 2005;7(1):61-69.

76. Shen H-M, Dai J, Chia S-E, Lim A, Ong C-N. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002;17(5):1266-1273.
77. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas Jr. AJ, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;80(3):531-535.
78. Troiano L, Granata ARM, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, et al. Mitochondrial Membrane Potential and DNA Stainability in Human Sperm Cells: A Flow Cytometry Analysis with Implications for Male Infertility. *Exp Cell Res* 1998;241(2):384-393.
79. Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 2002;17(5):1257-1265.
80. Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl* 2006;8(2):143-157.
81. Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas Jr. AJ, Falcone T, et al. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril* 2003;80(Suppl 2):844-850.
82. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005;26(3):349-353.
83. Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod* 2005;20(9):2590-2594.
84. Bolle P, Evandri MG, Saso L. The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception* 2002;65(4):313-315.
85. 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):320-323.
86. Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Said TM, Agarwal A, Abu Hmeidan F, et al. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril* 2009;92(2):572-577.
87. Makker K, Agarwal A, Sharma RK. Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction. *Indian J Exp Biol* 2008;46(7):491-497.
88. Gil M, Sar-Shalom V, Melendez Sivira Y, Carreras R, Checa MA. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013;30(4):479-485.
89. 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.e15-18.
90. Van Thillo G, Guidobono M, Young E, Ruiz Jorro M, Vila M, Rawe V. Biological safety and live births after selection of non-apoptotic spermatozoa during ICSI. *Fertil Steril* 2011;96(3, Suppl):S160-S161.

