

Métodos para la selección objetiva de espermatozoides competentes

Methods for the objective selection of competent spermatozoa

Laura Romany, Marcos Meseguer, Jose Remohí, Antonio Pellicer, Nicolas Garrido

Instituto Valenciano de Infertilidad, Plaza de la Policía Local 3, Valencia 46015, España
Universidad de Valencia, España.

Resumen

A pesar del desarrollo de las técnicas de reproducción asistida en los últimos años, y los logros alcanzados para solventar problemas de infertilidad, todavía existe un elevado porcentaje de tratamientos donde estas técnicas no son efectivas o son necesarios repetidos intentos para lograr una gestación.

La fisiología molecular del espermatozoide está siendo cada vez mejor caracterizada, y existen estudios que demuestran la implicación de diferentes procesos moleculares en la fisiopatología de la infertilidad masculina.

Recientemente, se han descrito métodos de selección espermática basados en las características moleculares y estructurales de los espermatozoides, que mejoran la calidad de la población de espermatozoides en cuanto a la integridad del ADN, movilidad, y morfología, aunque todavía existen pocos datos del uso clínico de estos métodos.

El objetivo principal de esta revisión es describir estos métodos, sus ventajas y limitaciones, y su efectividad clínica según la información bibliográfica disponible y de este modo evaluar su potencial uso para la optimización de los tratamientos de reproducción asistida.

Palabras clave: Espermatozoide. Infertilidad masculina. Espermograma. Selección espermática.

Summary

In spite of the achievements and development of the assisted reproduction techniques in the last years, there is still an elevated percentage of unsuccessful treatments, needing sometimes repeated attempts to reach pregnancy.

The molecular physiology in sperm is being better characterized, and some reports demonstrated the implication of different molecular processes in the pathophysiology of male infertility.

Recently, different sperm selection methods have been based on these molecular and structural diffe-

AYUDA: IMPIVA N° IMIDTG/2008/24, Generalitat Valenciana.

Correspondencia: Dra. Laura Romany
Instituto Valenciano de Infertilidad
Plaza de la Policía Local, 3
46015 Valencia
e-mail: lromany@ivi.es

rences of spermatozoa, improving quality of the sperm population regarding the integrity of DNA, motility and morphology, although there is very few information about the clinical use of these methods. The main objective of this review is to describe these methods, their advantages and their limitations and their clinic effectiveness according to available bibliography information and then discuss its potential use to the optimization of the assisted reproduction treatments.

Key words: Spermatozoa. Male infertility. Sperm analysis. Sperm selection.

INTRODUCCIÓN

Los avances en técnicas de reproducción asistida (TRA) han ido aumentando en los últimos años, no obstante las tasas de éxito no se han logrado mejorar recientemente. Con la introducción de la fecundación *in Vitro* (FIV), especialmente con la inyección intracitoplasmática (ICSI) el problema de la infertilidad causada por la disminución de la producción espermática está en parte solucionada, pero todavía queda lejos de ofrecer una efectividad diagnóstica y terapéutica del 100% (1).

La responsabilidad del éxito reproductivo está compartida entre el gameto masculino y el femenino. Prestando especial atención al varón, su contribución se estima en un 20% como factor único y un 50% en conjunción con el factor de infertilidad femenina (1).

Los gametos femeninos son un factor limitante en las TRA, ya que se generan muy pocos y todos ellos se utilizan, por lo que en principio no va a ser posible seleccionarlos. No obstante, existen países con leyes restrictivas en los que no es posible fecundar la cohorte completa, en estos casos los criterios de selección pueden ser importantes. Sin embargo, los espermatozoides pueden variar en número desde millones hasta cero, por tanto, en la mayoría de los casos encontramos una cantidad que excede a los oocitos, pudiendo estudiar fácilmente los no utilizados en reproducción asistida, pero que pertenecen al mismo ciclo espermatogénico.

El objetivo principal de cualquier técnica de selección de espermatozoides es obtener un número suficiente de espermatozoides viables y móviles capaces de fecundar un oocito (2).

Las técnicas actuales de selección de espermatozoides se basan fundamentalmente en la morfología por criterio subjetivo del embriólogo en los procedimientos de micromanipulación (3, 4) o bien en la auto selección de los espermatozoides por su viabilidad o movilidad, donde destacamos la centrifugación por gradientes de densidad que elimina el plasma seminal y otros constituyentes del fluido seminal dejando únicamente

los espermatozoides maduros viables (2, 5) o bien mediante el swim-up, técnica sencilla que se basa en que sólo los espermatozoides con buena movilidad podrán ascender al sobrenadante (6). Con ambas podemos recuperar los gametos con mayor capacidad fecundante potencial, pero hoy en día, ninguna de estas técnicas garantiza el éxito en reproducción asistida.

Para la evaluación objetiva del potencial fértil en un varón, el espermograma es la única herramienta diagnóstica recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), este nos da información esencial del estado clínico del varón, pero evalúa de forma superficial la capacidad del semen para iniciar un embarazo. Podemos detectar sobre todo problemas severos de la función testicular, que se traducen en la producción de pocos espermatozoides, con poca movilidad o con defectos en la forma. Existe una gran cantidad de casos en los que el varón presenta valores muy por encima de lo normal, y que no se logra un embarazo, y por el contrario, valores por debajo de la normalidad que sí lo logran. Esto puede darse incluso en eyaculados distintos de un mismo varón, demostrando, por tanto, que el valor diagnóstico de la prueba es limitado (7, 8)

Diferentes estudios demuestran que hay otros factores moleculares implicados en la infertilidad, que pueden ser potencialmente utilizados en el diagnóstico del eyaculado o en la selección de espermatozoides (9). Entre ellos, el estado del ADN en los espermatozoides, así como su perfil génico de ARN, y distintos parámetros de la capacidad defensiva frente al estrés oxidativo que parecen tener una relevancia alta en la calidad del semen (1, 10-13). Estas características son independientes del recuento, movilidad y morfología, es decir, no se correlacionan con el espermograma, y por tanto, se necesitan nuevas herramientas diagnósticas, ya que todavía existen causas de infertilidad por determinar aparte de las anomalías en el análisis básico. Aquellas causas moleculares de infertilidad masculina que están presentes en algunos espermatozoides pueden además ser utilizadas en la selección de los adecuados para mejorar los resultados en las TRA.

El objetivo principal de esta revisión es describir estos métodos, sus ventajas y limitaciones, y su efectividad clínica según la información bibliográfica disponible y de este modo evaluar su potencial uso para la optimización de las TRA.

NUEVOS MÉTODOS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA

Distintas tecnologías pueden ser útiles para seleccionar, o separar físicamente células con determinadas características moleculares o estructurales, de forma que se mantengan su viabilidad posterior y mejoren, por tanto, los resultados finales.

Microinyección Intracitoplasmática de Esperma Seleccionado Morfológicamente (IMSI)

En cuanto a las características estructurales, la morfología espermática ha sido reconocida como el mejor indicador de la fecundación natural, de la inseminación intrauterina (IUI) y de la FIV convencional. Actualmente, existen evidencias que sugieren que la morfología juega, también, un papel importante en el ICSI (14), no obstante, el criterio de la observación y selección de los espermatozoides por ésta es subjetivo por parte del especialista (3, 4).

Recientemente, se han introducido modificaciones en el procedimiento del ICSI convencional basadas en la microinyección de un espermatozoide seleccionado a través de un objetivo de elevada magnitud y que posee una morfología nuclear normal dando como resultado la técnica de IMSI (15).

Ésta presenta múltiples ventajas, entre ellas la selección del gameto en tiempo real, sin tinciones que lo dañen, con gran magnitud (a 6300x, frente a los 400x del ICSI convencional) y sin manipulaciones prolongadas del semen para separarlos del fluido seminal previamente a la microinyección (14). Para elegir el espermatozoide más adecuado se siguen las recomendaciones de la OMS, que determinan que éste debe ser simétrico, liso, oval, con la cola recta, el núcleo fijo y de color transparente. Gracias a esta técnica se puede descartar aquellos que son deformes o que presentan más de un 4% de vacuolas (residuos celulares), ya que con frecuencia se espera que un oocito fecundado con un espermatozoide defectuoso acabe en aborto.

De este modo, se reducen las tasas de aborto (3, 16, 17) y aumentan las tasas de embarazo de un 30% a un 66% comparadas con el ICSI convencional (14, 15, 17).

Los inconvenientes que presenta esta técnica son también muy evidentes y están dificultando su extensión generalizada. En primer lugar el tiempo medio extra de duración del procedimiento es considerable y oscila entre 1,5 y 5 horas, en segundo lugar su elevado coste, hacen en principio que esta técnica no esté disponible para cualquier laboratorio y que solo sea aconsejable cuando nos encontramos con un semen muy pobre, y en casos repetidos de fallos de FIV/ICSI (3). A pesar de las evidencias existentes, son necesarios estudios con mayores tamaños muestrales para demostrar su eficacia clínica y definir mejor sus indicaciones.

Magnetic activated cell sorting (MACS)

Las características fisiológicas a nivel molecular de los espermatozoides pueden conducir a un éxito o un fracaso en las TRA (18).

En una muestra de semen los varios millones de espermatozoides poseen características moleculares distintas. Éstas han sido estudiadas y descritas en los distintos procesos implicados en la fertilidad del varón, pero pocas de ellas pueden ser utilizadas para seleccionar físicamente el espermatozoide óptimo (1).

Basándonos en estas características existen diferentes tecnologías que nos podrían ayudar a aumentar la eficiencia en las TRA.

Una de las tecnologías disponibles es la selección celular inmunomagnética o MACS (2), utilizada ya clínicamente con éxito en distintos ámbitos. En el campo de la reproducción inicialmente se utilizó para seleccionar y caracterizar a los espermatozoides acrosoma reaccionados, para separar distintas células dentro de una población o aislar leucocitos (2), no obstante, los mejores ejemplos de su uso clínico vienen dados por el aislamiento de células progenitoras raras de sangre de cordón umbilical, y el uso de sangre periférica para sustituir a la médula ósea para el trasplante en pacientes tras quimioterapia o radioterapias (19, 20).

Se basa en el uso de MicroBeads (MB) que son partículas superparamagnéticas de aproximadamente 50 nanómetros de diámetro, conjugadas con proteínas o anticuerpos (Ac.) específicos para su unión a las células o marcadores de interés. Requieren unas columnas para separar físicamente las células en función de si están o no marcadas, gracias a un intenso campo magnético creado en la matriz de la columna, suficiente para retener las células unidas con una mínima cantidad de MB, mientras que las células no unidas pasan a través de la columna y pueden ser recogidas. Las células unidas pueden posteriormente ser liberadas de la columna mediante lavados. Ambas fracciones son separadas con

elevada pureza, manteniendo su estructura, función óptima y viabilidad (2) (figura 1).

La simplicidad, bajo coste, y sensibilidad a los reactivos inmunoespecíficos son varias de las ventajas

que ofrece la separación celular magnética. El éxito de esta aplicación depende, principalmente, de una estrategia de unión magnética eficiente y específica (2).

Usando esta tecnología podríamos obtener esper-

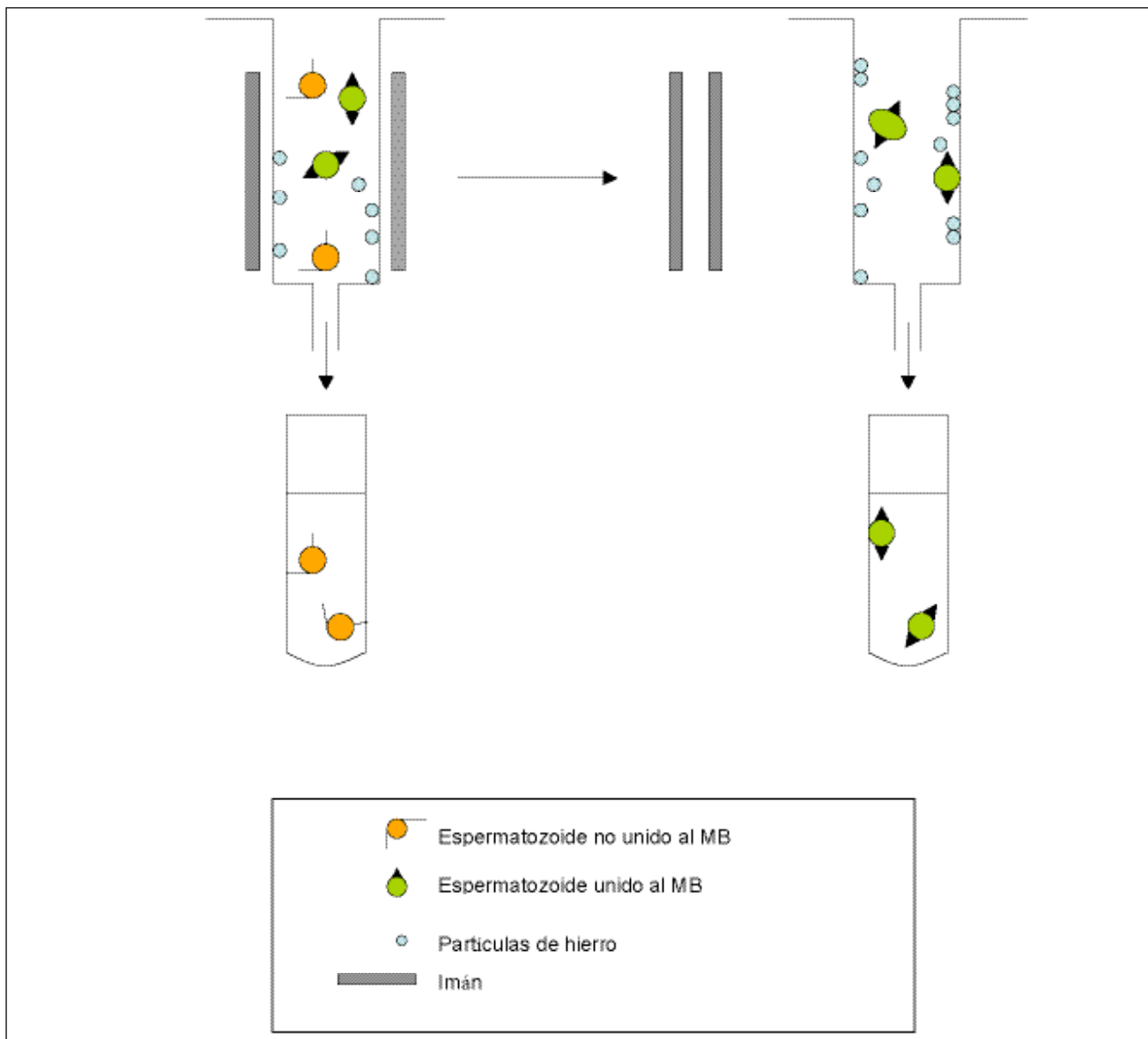


Figura 1

Tecnología MAC S. Selección inmunomagnética

1- La fracción negativa es la que corresponde a los espermatozoides que no se han unido a los MB y por tanto no quedan retenidos en la columna.

2- La fracción positiva es la que corresponde a los espermatozoides que se han unido a los MB y por tanto quedan retenidos en la columna debido al campo magnético de alta intensidad que se ejerce a causa del imán y de las partículas de hierro que poseen las columnas.

Si la selección es negativa, nos interesa la fracción 1 que es la que contiene los espermatozoides no unidos (caso de apoptosis y ubiquitina).

Si la selección es positiva, la fracción que posee los espermatozoides óptimos es la fracción 2 (caso de PAF Y AH).

matosoides con una calidad superior en términos de movilidad, viabilidad y marcadores apoptóticos, como son la reducción de la rotura del potencial de membrana mitocondrial (2, 21, 22), así como, una baja incidencia de fragmentación de ADN (2, 23), y un aumento del potencial de fecundación (2).

Said y su equipo usando un modelo animal observaron una mejora en las TRA, tanto de IUI como de FIV (2). Dirican y cols. reportan que esta tecnología es segura y fiable también para ICSI utilizando en este caso espermatozoides y oocitos humanos (22), aunque para este último procedimiento son necesarias más investigaciones (2). Además aumentan las tasas de división embrionaria, de embarazo clínico y bioquímico (2, 22) y produce una mejora en la supervivencia post-descongelación (24).

Distintos procesos o fenotipos moleculares son candidatos a ser utilizados como base de la separación molecular en espermatozoides aplicando esta tecnología, y para ello, deben ser marcadores de membrana, y haber estado relacionados con la infertilidad masculina en trabajos previos de forma que su presencia es diferente en espermatozoides de varones infértiles, entre ellos:

1. **Apoptosis:** modo de muerte celular programada basada en mecanismos genéticos que inducen una serie de alteraciones celulares, morfológicas y bioquímicas llevando a la célula al suicidio sin provocar una respuesta inflamatoria. Se da intratesticularmente para mantener el número de células germinales adecuado (25). No se conoce con exactitud si los marcadores apoptóticos detectados en los espermatozoides son residuos de un proceso apoptótico incompleto empezado antes de la eyaculación o son el resultado de una apoptosis iniciada después de la post-eyaculación (25), pero sí está demostrado que en el eyaculado hay espermatozoides con este proceso iniciado, y con las mismas características de motilidad y forma que los espermatozoides normales, lo que lleva a pensar que si los primeros fecundaran un oocito, inducirían un fallo reproductivo (26, 27).

La externalización de la fosfatidilserina (PS) (encontrada en condiciones normales en la cara interna de la membrana), entre otros, es considerado un marcador apoptótico (2, 25, 28).

En este sentido, la Anexina V presenta ciertas características de interés para evaluar esta situación, porque se une específicamente a la PS, pero no es capaz de atravesar la membrana. Por ello, esta proteína conjugada con los MB se pueden unir magnéticamente a los espermatozoides con la membrana comprometida e identificar aquellos que estén en apoptosis o

con el proceso apoptótico iniciado (22), éstos quedarán retenidos en las columnas y serán la fracción anexina V positiva y los espermatozoides que no estén unidas a las partículas paramagnéticas y que eluyen a través de la columna, la fracción anexina V negativa, serán los candidatos a ser utilizados como óptimos.

2. **Ubiquitina:** La ubiquitinación es un mecanismo universal para el reciclaje de proteínas, por el cual los sustratos defectuosos son marcados por el acoplamiento covalente de una o más moléculas de ubiquitina (29). No obstante, Muratori y cols. encontraron una correlación positiva entre los porcentajes de ubiquitina en semen y los parámetros seminales, especialmente con la morfología, sugiriendo que la ubiquitinación podría tener un papel positivo en la función espermática. Es posible que se dé un patrón diferente de distribución de esta proteína en espermatozoides con morfología normal y anormal (30), de hecho la ubiquitina de la superficie del espermatozoide es la única que se relaciona con la fertilidad (29, 31, 32). Elevados valores de ésta se correlacionan inversamente con la cantidad y movilidad de los espermatozoides y es proporcional al número de formas anormales (32), siendo mayor el número de defectos en la cabeza o en el axonema (33). Estos altos valores se han encontrado en hombres con síndromes de infertilidad hereditaria (32, 34), y en varios casos de infertilidad idiopática (29, 32), por ende, se asocia a mala calidad espermática.

Con el uso de Ac. monoclonales específicos unidos a los MB es posible separar los espermatozoides con ubiquitina en su superficie, a través de una selección negativa, ya que quedarán unidos magnéticamente a la columna (al igual que con la Anexina V). Los que no han quedado unidos son los candidatos a tener una mayor calidad (31).

3. **Ácido hialurónico (AH):** hasta el momento, solamente se ha descrito el uso del método PICSI® basado en una placa impregnada en hialuronato (mayor competente del cúmulus, capa de células que rodea al oocito) que mide la capacidad de unión a ella de los espermatozoides funcionalmente competentes. Los espermatozoides maduros tienen receptores del AH en su membrana, y son capaces de unirse a la base de esta placa. Se ha visto en éstos una menor tasa de aneuploidías, además ausencia de fragmentación de ADN, del marcador de apoptosis caspasa-3, de retención citoplásmica (asociada a la producción de radicales libres, y por tanto, daño celular), así como de histonas persistentes. Todo ello indicador de buena salud espermática (35).

Distintos estudios sugieren que los espermatozoides seleccionados por PICSI® aumentan la tasa de embarazos clínicos, reduciendo los abortos (35, 36).

La posibilidad de seleccionarlos mediante inmunoseparación permite la posibilidad de analizar la influencia de los diferentes receptores del AH, que son CD44 (HCAM), TLR-2 y TLR-4 (toll-like receptors 2 y 4) e intentar un enriquecimiento de los espermatozoides con las características fisiológicas más apropiadas, para posteriormente utilizarlos en reproducción asistida. La selección sería positiva, ya que los espermatozoides que nos interesan son los que expresan los receptores de AH y serían marcados, bien con Ac. anti receptores de AH y con MB, bien con la molécula de AH unida a MB, pero de ambas maneras quedarían retenidos en la columna. Una vez recogida la fracción negativa, eluiríamos la inmunomarcada y tendríamos los espermatozoides maduros. Aunque todavía no hay publicaciones científicas que hayan demostrado su uso clínico en este sentido.

También se está estudiando la posibilidad de observar por la técnica del IMSI los espermatozoides que tengan expresados los receptores de AH. A pesar de que existen pocos datos la idea de estar indicado para seleccionar los espermatozoides maduros es interesante (3). Un estudio reciente compara el procedimiento de ICSI con la selección del espermatozoide con receptores de AH en 50 oocitos de parejas distintas. Las tasas de fecundación son significativamente más altas (79,4% vs. 67,7%), pero no existen diferencias entre las siguientes etapas de desarrollo. Por tanto, es necesaria más información para cualquier conclusión sobre la técnica (37).

4. Factor de activación plaquetario (PAF): el PAF es un fosfolípido señalizador con propiedades biológicas pleiotrópicas. Juega un papel significativo en la reproducción, ya que está presente en los espermatozoides, tiene una correlación positiva con la movilidad y con el embarazo (38, 39) y puede ser un biomarcador de la capacitación espermática (40). A pesar de que el mecanismo exacto no está claro, se ha demostrado en varias especies que el PAF puede influenciar la función espermática por su efecto en la movilidad, capacitación, reacción acrosómica y fecundación (41). La presencia de receptores PAF es un requisito necesario para que esta vía fisiológica sea efectiva y se ha hipotetizado que la ausencia de estos receptores son los responsables de los malos resultados en las TRA (38).

El patrón de distribución es significativamente distinto entre los receptores de espermatozoides normales y anormales. También, existen claras diferencias entre las concentraciones de PAF y los receptores en hombres fértiles e infértiles sugiriendo que los espermatozoides inmóviles contienen más PAF que los

móviles debido a la pobre o inexistente actividad de los receptores de PAF (42).

Utilizando los Ac. específicos de estos receptores conjugados con las esferas inmunomagnéticas, podemos seleccionar positivamente a los espermatozoides con presencia de receptores de PAF y por tanto, aumentar las tasas de éxito de las TRA.

ELECTROFORESIS

Los altos niveles de fragmentación del ADN o de oxidación del mismo se asocian con peores patrones de desarrollo embrionario e incluso con menores tasas de fecundación (12, 13, 43). Las evidencias son múltiples y tienen origen en múltiples estudios desarrollados con diferentes métodos de detección; Comet Assay, SCSA, Tunel, SCD, etc. (18).

Por ello, Ainsworth ha desarrollado un método rápido, no invasivo y efectivo que supone el aislamiento de los espermatozoides por electroforesis con la mínima cantidad de ADN dañado (44, 45).

El método se basa en dos principios básicos; su carga y su tamaño, considerándose los de mejor calidad los más electronegativos (44-47) y los de menor tamaño (45, 48).

Siguiendo estos principios se desarrolló un sistema direccional de movimiento de espermatozoides vivos a través de un campo eléctrico y basándose en el criterio de exclusión por tamaño utilizando para ello filtros de 5 micro-M de policarbonato unidas a membranas de 15 KDa de poliacrilamida que permiten el tránsito libre de electrolitos (45) (figura 2).

Este dispositivo ya se ha probado en muestras de semen eyaculado, y se han estudiado sus limitaciones con muestras de mala calidad (congelado y las biopsias de testículo). Por tanto, es un método válido para todo tipo de muestras, normales y, también, difíciles (45).

Se ha descrito un embarazo a término, aunque es necesaria una casuística más amplia para conseguir su validación clínica. Este procedimiento (tras su validación clínica) podría ser de tipo preventivo en los pacientes con elevados valores de fragmentación del ADN (45).

Los resultados obtenidos a través de este sistema de separación demuestran en un primer momento que son tan efectivos como la separación por gradientes de densidad o swim-up, y sus tasas de recuperación son de aproximadamente el 20% de la cantidad inicial de espermatozoides, pero estas dos técnicas difieren de este nuevo método en que emplean mucho tiempo de trabajo, y, además, no evitan los efectos dañinos producidos por la centrifugación (por ejemplo: la generación de especies reactivas) (49).

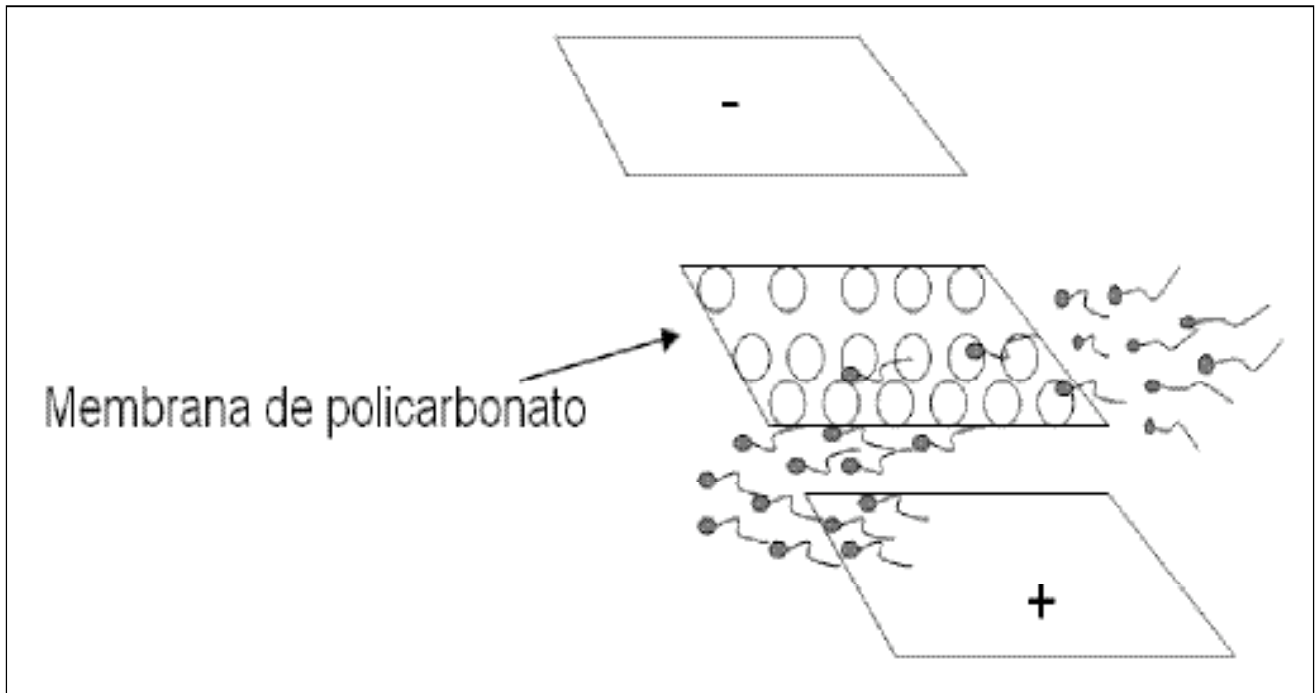


Figura2

Electroforesis espermática

Un sistema direccional de movimiento de espermatozoides vivos a través de un campo eléctrico y basándose en el criterio de exclusión por tamaño utilizando para ello filtros de policarbonato y membranas de poliacrilamida.

A pesar de los beneficios de esta técnica, la complejidad que presenta el aparato de separación puede ser una limitación para su uso generalizado en los laboratorios de andrología, sobre todo para aquellos con recursos limitados (2).

BIRREFRINGENCIA

Como ya hemos comentado, seleccionando subjetivamente el espermatozoide óptimo para ICSI por el procedimiento habitual una cantidad considerable de información de la ultraestructura se pierde (50). Basándose en una aproximación similar a la del IMSI, pero con la idea de evaluar la distribución de las organelas de los espermatozoides en la cabeza, pieza media y cola, se plantea para el ICSI el uso de un microscopio invertido polarizado con un sistema óptico nuevo y adaptado al espermatozoide como una herramienta nueva para la selección del mejor espermatozoide basada en la birrefringencia de éste, ya que su textura protoplásmica tiene propiedades anisotrópicas (51, 52).

El efecto de birrefringencia se genera cuando al cruzar una estructura anisotrópica el rayo de luz inci-

dente se refracta en dos rayos polarizados que viajan a distinta velocidad. La retardancia del rayo lento relativa al rayo rápido produce tal efecto (52).

Asociado a la organización longitudinal y fuerte compactación de los filamentos de las nucleoproteínas y por la organización también longitudinal de los filamentos subacrosomales se produce en la cabeza del espermatozoide maduro un fuerte efecto de birrefringencia. Sólo los núcleos no picnóticos pueden ser birefringentes (núcleo picnótico es aquel que se torna redondo, pequeño y oscuro, en el que no se distingue el normal patrón de distribución de la cromatina). Lo mismo ocurre en la cola y en la pieza media, por su organización microtubular del axonema y el condrioma, respectivamente (51).

La ventaja de esto es que es un método no invasivo, se puede seleccionar espermatozoides birrefringentes para el ICSI, sin que afecte a su viabilidad y movilidad y permite identificar células espermáticas con vacuolas, porque el área correspondiente carece de birefringencia (51).

El estudio de Gianaroli confirma que la presencia de birrefringencia en la cabeza del espermatozoide puede reflejar el buen estado de salud de la célula es-

permática, porque la proporción del espermatozoide birrefringente varía significativamente en relación con la concentración de la muestra, la vitalidad y la movilidad y que a mayor birrefringencia menor porcentaje de aneuploidías. Esta correlación es directamente proporcional a la calidad de la muestra, sugiriendo que en sémenes patológicos con las estructurales protoplásmicas alteradas tienen el efecto de la birrefringencia afectado (51).

No obstante, Damasceno y cols. hicieron un estudio con un microscopio invertido polarizado, pero sin adaptarlo al espermatozoide que también mide la birrefringencia, ambos grupos coinciden en que el espermatozoide normal posee elevada retardancia debido a su fuerte compactación de ADN y su elevada organización molecular, pero, estos últimos sometieron a los espermatozoides a luz ultravioletas (UV), dañando por tanto su ADN. Midieron la retardancia de las cabezas de los espermatozoides antes y después de la exposición a los UV, observando que se producían elevados cambios respecto a esta retardancia y que aumentaba significativamente comparándolo con los valorados antes de la exposición (53).

Debido a las ideas tan controvertidas de estos grupos son necesarios más estudios al respecto, ya que esta estrategia puede proporcionar no sólo una guía criterio para la selección del espermatozoide, sino también, una herramienta para entender la fisiología espermática, es decir, puede cambiar drásticamente la definición de infertilidad por contribuir con información adicional de las condiciones fisiológicas y el potencial en la evaluación de rutina del factor humano, así como, la modificación de la técnica de preparación del semen (51).

DISCUSIÓN

A pesar de los avances producidos en el campo de la reproducción asistida las tasas de éxito no son suficientes y requieren de mejoras para que la efectividad se aproxime cada vez más al 100%.

El reducido número de gametos femeninos pueden considerarse como un factor limitante de los tratamientos, en cambio, la producción testicular de espermatozoides, puede variar, desde varios millones de espermatozoides a cero y difieren todos en función de sus características, tanto en función de su morfología o movilidad, así como también en sus propiedades intrínsecas o moleculares.

Por este motivo, es imprescindible disponer de criterios objetivos para realizar la selección de espermatozoides con una mayor posibilidad de originar embriones competentes y que resulten en un recién nacido vivo.

La trascendencia de estas pruebas diagnósticas (y/o posteriormente terapéuticas) utilizando las distintas tecnologías de separación celular descritas es muy elevada (tabla 1), ya que, hasta el momento sólo son válidos los resultados del espermiograma de rutina, y con este procedimiento es difícil definir las muestras con la máxima posibilidad de iniciar la gestación. De esta manera, se podrá determinar que método de selección es más eficaz en relación al tipo de paciente sin que influya el factor humano en ninguna de las fases y así mejorar el resultado final de cualquiera de las técnicas de reproducción asistida. Además de aportar nueva información sobre los espermatozoides y sus condiciones fisiológicas.

No obstante, son necesarios muchos más estudios para que cualquiera de estos métodos selectivos basados en pruebas diagnósticas de carácter molecular pasen a ser terapéuticos y ayuden a conseguir el resultado ideal en cualquier TRA, el embarazado y consecuente recién nacido vivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Garrido N, Remohi J, Martínez-Conejero JA, García-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M.:** Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online*. 2008 Dec;17(6): 855-65.
2. **Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U.:** Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl*. 2008 Mar-Apr;29(2): 134-42.
3. **Ubaldi F, Rienzi L.:** Morphological selection of gametes. *Placenta*. 2008 Oct; 29 Suppl B:115-20.
4. **De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A.:** Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2003 Jan; 79(1): 42-8.
5. **Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ, Jr, Álvarez JG.:** Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod*. 2001 Sep; 16(9): 1912-21.
6. **Sellés E, Pérez I, Pellicer J, López MA.:** Capacitación espermática In: Remohí J, Cobo A, Romero JL, De los Santos MJ, Pellicer A, editors. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de reproducción asistida*. Tercera ed. España: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.U; 2008; p. 25-27.

Tabla 1*Métodos diagnósticos para la selección de los espermatozoides*

Tabla que consta de distintas pruebas que se pueden hacer basándose en las características moleculares de los espermatozoides, siendo pruebas objetivas. Considerando dentro de estas pruebas la densidad de gradientes y el swim-up, a pesar de ser técnicas que se basan en la viabilidad y movilidad, respectivamente, y no estarían dentro de estas características moleculares, pero son métodos de auto selección, son los mismos espermatozoides los que se seleccionan

TÉCNICA	CRITERIO DE SELECCIÓN	APLICACIÓN	VENTAJAS	INCONVENIENTES
SWIM UP (6)	MOVILIDAD	Espermatozoides con buena movilidad ascienden al sobrenadante, y se pueden recuperar los gametos con capacidad fecundante potencial semejante a la población fértil	-Rápida -Bajo coste	-Técnica complementaria -No suficiente exitosa
DGC (2, 5)	VIABILIDAD	Eliminar el plasma seminal y otros constituyentes del fluido seminal dejando únicamente los espermatozoides maduros viables	-Rápida -Bajo coste	-Técnica complementaria -No suficiente exitosa
IMSI (3, 16, 17)	MORFOLOGÍA	Elección del mejor espermatozoide simétrico, liso, oval, con la cola recta, el núcleo fijo y desechar los deformes o que presentan más de un 4% de vacuolas (residuos celulares)	-Selección del gameto en tiempo real -Sin tinciones -Gran magnitud a 6300x -Sin manipulaciones prolongadas del semen	-Entre 1,5 y 5 h. -Elevado coste
MACS (2)	MOLECULAR	Separación celular inmunomagnética: -apoptosis -ubiquitina -PAF -HA	-No alteran la estructura, función ni actividad de las células unidas -Elevada pureza -Bajo coste -Sensibilidad -Simplicidad -Calidad superior en movilidad, viabilidad y marcadores apoptóticos.	-Necesarios estudios clínicos al respecto.
POLSCOPE (51,52)	MOLECULAR	Estudiar la birefringencia y retardancia de los espermatozoides	-Método no invasivo -La birefringencia refleja el buen estado de salud de espermatozoides identificando aquellos que tengan vacuolas por carecer de ésta. -Identifica los acrosoma reaccionado de los que no lo están	-Necesarios estudios clínicos
ELECTROFORESIS (44)	MOLECULAR	Aislar espermatozoides humanos por tamaño y carga con la mínima cantidad de ADN dañado	-Útil en muestras normales, congeladas, descongeladas, biopsias. -No invasivo -Rápido	-Complejidad aparato -Necesario mayor casoística para validación clínica.

7. **Mollá M, Tejera A, Muriel L.:** Examen del semen fresco In: Remohí J, Cobo A, Romero J, De los Santos MJ, Pellicer A, editors. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de reproducción asistida. tercera ed. España: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U; 2008; p. 1.
8. **Garrido N, Meseguer M, Alvarez J, Simon C, Pellicer A, Remohi J.:** Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 2004 Oct;82 Suppl 3:1059-66.
9. **Garrido N, Martínez-Conejero JA, Jauregui J, Horcajadas JA, Simón C, Remohi J, Meseguer M.:** Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril.* 2008 Mar 24.
10. **Meseguer M, Martínez-Conejero JA, Muriel L, Pellicer A, Remohi J, Garrido N.:** The human sperm glutathione system: A key role in male fertility and successful cryopreservation. *Drug Metab Lett.* 2007 Apr; 1(2): 121-6.
11. **Meseguer M, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J, Garrido N.:** Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril.* 2006 Nov;86(5):1376-85.
12. **Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ, Meseguer M.:** Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2006 Feb; 85(2): 371-83.
13. **Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, Remohi J, Fernandez JL.:** Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril.* 2008 Nov 10.
14. **Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B.:** The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod.* 2005 Jan; 20(1): 185-90.
15. **Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y.:** Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril.* 2003 Dec; 80(6): 1413-9.
16. **Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S, Cassuto G, Zech NH.:** Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online.* 2008 Nov;17(5):617-27.
17. **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 Jan-Feb; 23(1): 1-8.
18. **Aguilar C, Garrido N, Vitoria T, Fernandez JL, Meseguer M.:** Biochemical markers of male infertility: The key role of DNA damage. 2008;3 (4), xxx-xxxx (*Expert Rev. Obstet. Gynecol.*)
19. **Weissman IL.:** Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science.* 2000 Feb 25; 287(5457): 1442-6.
20. **Powles R, Mehta J, Kulkarni S, Treleaven J, Millar B, Marsden J, Shepherd V, Rowland A, Sirohi B, Tait D, Horton C, Long S, Singhal S.:** Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: A randomised trial. *Lancet.* 2000 Apr 8; 355(9211): 1231-7.
21. **de Vantery Arrighi C, Lucas H, Chardonens 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 Jan 8; 7: 1.
22. **Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, Camsari 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 Aug; 25(8): 375-81.
23. **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 Mar;74(3):530-7.
24. **Grunewald S, Paasch U, Said TM, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ.:** Magnetic-activated cell sorting before cryopreservation preserves mitochondrial integrity in human spermatozoa. *Cell Tissue Bank.* 2006; 7(2): 99-104.
25. **Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A.:** The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod.* 2007 May; 22(5): 1413-9.
26. **Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G. :** Cellular maturity and apoptosis in human sperm: Creatine kinase, caspase-3 and bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod.* 2004 May; 10(5): 365-72.
27. **Sakkas D, Seli E, Manicardi GC, Nijs M, Ombelet W, Bizzaro D.:** The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: Did apoptosis fail? *Hum Fertil (Camb).* 2004 Jun; 7(2): 99-103.

28. **Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ, Jr, Glander HJ, Agarwal A.:** Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod.* 2004 Dec; 71(6): 1828-37.
29. **Sutovsky P, Terada Y, Schatten G.:** Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum Reprod.* 2001 Feb; 16(2): 250-8.
30. **Muratori M, Marchiani S, Forti G, Baldi E.:** Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen. *Hum Reprod.* 2005 Apr; 20(4): 1035-43.
31. **Ozanon C, Chouteau J, Sutovsky P.:** Clinical adaptation of the sperm ubiquitin tag immunoassay (SUTI): Relationship of sperm ubiquitylation with sperm quality in gradient-purified semen samples from 93 men from a general infertility clinic population. *Hum Reprod.* 2005 Aug; 20(8): 2271-8.
32. **Sutovsky P, Hauser R, Sutovsky M.:** Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. *Hum Reprod.* 2004 Mar; 19(3): 628-38.
33. **Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, Teodosio C, Paiva A, Ramalho-Santos J.:** Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertil Steril.* 2007 Mar; 87(3): 572-83.
34. **Rawe VY, Olmedo SB, Benmusa A, Shiigi SM, Chemes HE, Sutovsky P.:** Sperm ubiquitination in patients with dysplasia of the fibrous sheath. *Hum Reprod.* 2002 Aug; 17(8): 2119-27.
35. **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 Dec; 84(6): 1665-73.
36. **Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L.:** Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril.* 2003 Jun; 79 Suppl 3:1616-24.
37. **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 May; 25(5): 197-203.
38. **Toledo AA, Mitchell-Leef D, Elsner CW, Slayden SM, Roudebush WE.:** Fertilization potential of human sperm is correlated with endogenous platelet-activating factor content. *J Assist Reprod Genet.* 2003 May; 20(5): 192-5.
39. **Roudebush WE, Purnell ET.:** Platelet-activating factor content in human spermatozoa and pregnancy outcome. *Fertil Steril.* 2000 Aug; 74(2): 257-60.
40. **Roudebush WE.:** Seminal platelet-activating factor. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Feb; 33(1): 69-74.
41. **Ali A, Virirak Kattygnarath T, Benkhalifa M, Miron P.:** Essential role of platelet-activating factor in male reproduction: A review. *Reprod Biomed Online.* 2007 Feb; 14(2): 250-5.
42. **Roudebush WE.:** Role of platelet-activating factor in reproduction: Sperm function. *Asian J Androl.* 2001 Jun; 3(2): 81-5.
43. **Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohi J, Garrido N.:** The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: A new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril.* 2008 May; 89(5): 1191-9.
44. **Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ.:** Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005 Aug; 20(8): 2261-70.
45. **Ainsworth C, Nixon B, Jansen RP, Aitken RJ.:** First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa. *Hum Reprod.* 2007 Jan; 22(1): 197-200.
46. **Giuliani V, Pandolfi C, Santucci R, Pelliccione F, Macerola B, Focarelli R, Rosati F, Della Giovampaola C, Francavilla F, Francavilla S.:** Expression of gp20, a human sperm antigen of epididymal origin, is reduced in spermatozoa from subfertile men. *Mol Reprod Dev.* 2004 Oct; 69(2): 235-40.
47. **Kirchhoff C, Schroter S.:** New insights into the origin, structure and role of CD52: A major component of the mammalian sperm glycocalyx. *Cells Tissues Organs.* 2001; 168(1-2): 93-104.
48. **Aitken RJ.:** Sperm function tests and fertility. *Int J Androl.* 2006 Feb; 29(1): 69, 75; discussion 105-8.
49. **Fleming SD, Ilad RS, Griffin AM, Wu Y, Ong KJ, Smith HC, Aitken RJ.:** Prospective controlled trial of an electrophoretic method of sperm preparation for assisted reproduction: Comparison with density gradient centrifugation. *Hum Reprod.* 2008 Dec; 23(12):2646-51.
50. **Baccetti B.:** Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2004 Jul-Oct; 36(3-4):333-9.
51. **Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP, Baccetti B.:** Sperm head's birefringence: A new criterion for sperm selection. *Fertil Steril.* 2008 Jul; 90(1): 104-12.
52. **Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B.:** Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2008 Dec 6
53. **Damasceno-Vieira A, Silva C, Ying Y, Mayer J, Plosker SM, Keefe DL.:** A non-invasive method to assess DNA damage in individual sperm. [Internet]. ; 2008. S11 p.