



REVISIÓN

La selección espermática mediante técnica de separación magnética de células activadas (MACS) en las técnicas de reproducción asistida



Yamileth Motato-Moscoso*, Ana Ortega-García y Marita Espejo-Catena

Instituto FIVIR, Valencia, España

Recibido el 3 de mayo de 2017; aceptado el 21 de junio de 2017

Disponible en Internet el 14 de agosto de 2017

PALABRAS CLAVE

Fragmentación de ADN;
Células activadas magnéticamente;
Apoptosis;
Selección espermática

KEYWORDS

DNA fragmentation;
Magnetically activated cells;
Apoptosis;
Sperm selection

Resumen La integridad espermática es esencial para asegurar la competencia reproductiva. Varios estudios han demostrado que los espermatozoides eyaculados presentan cambios asociados con la apoptosis, en particular EPS, disminución de la integridad PMM y fragmentación del ADN.

Las células activadas magnéticamente con microesferas de anexina v reconocen los residuos de fosfatidilserina externalizados en la superficie de los espermatozoides apoptóticos. Además, el uso de microesferas de anexina v para seleccionar espermatozoides no apoptóticos reduce el porcentaje de células alteradas con fragmentación de ADN y aneuploidía, mejorando la posibilidad de embarazo después de los tratamientos de reproducción asistida.

En esta revisión nuestro objetivo es evaluar el posible valor de la selección por células activadas magnéticamente en pacientes infértiles sometidos a tratamientos de reproducción asistida.

© 2017 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

The Sperm Selection By Magnetic Activated Cell Sorting (Macs) In Assisted Reproduction Techniques

Abstract The sperm integrity is essential to ensure reproductive competence. Several studies have shown that ejaculated sperm exhibit changes associated with apoptosis, in particular externalisation of phosphatidylserine, decreased MMP integrity, and DNA fragmentation.

The classification of magnetically activated cells with Annexin V microspheres recognises phosphatidylserine residues externalised on the surface of apoptotic spermatozoa. In addition,

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: laboratorio@fivir.es (Y. Motato-Moscoso).

the use of Annexin V microspheres to select non-apoptotic spermatozoa reduces the percentage of altered cells with DNA fragmentation and aneuploidy, improving the possibility of pregnancy after assisted reproduction techniques.

In this review, our objective is to evaluate the possible value of activated cell magnetic classification technology in infertile patients undergoing assisted reproduction techniques.

© 2017 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Aunque en las últimas décadas los tratamientos de reproducción asistida han ido incrementando su efectividad en términos de tasa de gestación y tasa de recién nacido vivo, aún hay un número significativo de parejas que siguen sin conseguir el embarazo. Al contrario de lo que ocurre con los ovocitos, que pueden obtenerse en número limitado tras un tratamiento de estimulación ovárica controlada, una muestra de eyaculado puede llegar a contener hasta cientos de millones de espermatozoides por mililitro (ml), y cada uno de ellos puede presentar características moleculares diferentes como resultado de los procesos de recombinación meiótica durante la espermatogénesis (García-Herrero et al., 2011).

Se estima que la infertilidad masculina, directa o indirectamente, es la responsable aproximadamente del 50% de los casos de parejas en edad reproductiva con problemas relacionados con la fertilidad (Schlegel 2009), por lo que queda clara la necesidad de analizar las características seminales como parte fundamental en el estudio de la pareja infértil. De forma rutinaria, y como punto de partida, se examina el volumen del eyaculado, la concentración, la motilidad y la morfología espermática según los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), (World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research 2010); sin embargo se ha podido determinar que entre un 10% y un 15% de los hombres que presentan parámetros dentro de estos rangos de normalidad son infértiles. Por tanto, el seminograma, una prueba básica utilizada para la orientación diagnóstica y terapéutica de la pareja, no es suficiente para predecir el potencial fecundante del espermatozoide, la capacidad de dar lugar a un embrión sano, un embarazo evolutivo y tampoco tiene la capacidad de suministrar información acerca de otras posibles causas de la infertilidad, que incluye tanto defectos en la membrana del espermatozoide (Rajeev y Reddy 2004), como alteraciones genéticas/moleculares (Nakamura et al., 2001, Ferlin et al., 2007), defectos en la cromatina (Erenpreiss et al., 2006), o el efecto de los factores ambientales (Sinawat, 2000), todas con un impacto negativo en los tratamientos de reproducción asistida (TRA) (Seli et al., 2004).

Es por esta razón que en la rutina clínica, y con el objetivo de realizar un análisis más exhaustivo de la calidad espermática, se han introducido otras pruebas, como la tinción vital, la prueba hipoosmótica, las pruebas de especies reactivas de oxígeno (o *reactive oxygen species*) y la prueba de fragmentación del ADN espermático. En particular, la evaluación del

daño del ADN en los espermatozoides y su impacto en los resultados reproductivos ha recibido especial atención, ya que una cantidad creciente de datos demuestran que los altos niveles de fragmentación del ADN están correlacionados con menores tasas de fecundación, de implantación y un aumento de la incidencia de aborto (Giwercman et al., 2010, Zini y Sigman 2009, Larson et al., 2000).

El daño en la estructura de la cromatina espermática puede ocurrir en cualquier etapa de la espermatogénesis y puede ser inducido por factores internos como la apoptosis, la rotura de ADN no reparada durante la remodelación de la cromatina en la espermiogénesis, los radicales libres de oxígeno durante el transporte de los espermatozoides a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo, las caspasas endógenas y endonucleasas e, incluso, por factores externos como tóxicos ambientales, quimioterapia, radioterapia (Sakkas y Alvarez 2010), condiciones y tiempo de almacenamiento o técnicas de capacitación espermática (Lo et al., 2002, Jackson et al., 2010).

Por otra parte, se ha planteado la hipótesis de que los espermatozoides aneuploides pueden también conducir a la fragmentación del ADN bloqueando el desarrollo espermático, y producir de esta manera espermatozoides anómalos (Muriel et al., 2007). Aunque algunos autores apoyan este planteamiento al evidenciar una correlación positiva entre la presencia de aneuploidías y fragmentación espermática (Enciso et al., 2013), existen otros que no han encontrado dicha correlación (Balasuriya et al., 2011, Bronet et al., 2012). Además, y aunque se ha reportado que las aneuploidías de origen materno son las principales causas de los abortos espontáneos después de un tratamiento de reproducción asistida, se ha podido establecer que entre el 5-10% de las aneuploidías autosómicas y entre el 50-80% de las aneuploidías cromosómicas sexuales tienen origen paterno (Hassold et al., 2007, Nicolaidis y Petersen 1998).

Así pues se ha intentado analizar la integridad del ADN previo a un tratamiento de infertilidad, pero los métodos utilizados para detectar roturas o el nivel de protaminación o compactación de la cromatina tienen la particularidad de generar la destrucción del espermatozoide (Tavalaee et al., 2009), lo que imposibilita su posterior uso en estos tratamientos.

Apoptosis espermática e infertilidad masculina

La apoptosis es el conjunto de alteraciones celulares morfológicas y bioquímicas que conducen a la muerte celular, y puede originarse como respuesta a estímulos específicos,

como es la exposición a radiación ionizante y agentes quimioterapéuticos, o ser inducida como consecuencia de una lesión o estrés celular. De llevarse a cabo de manera no regulada favorece la presencia de espermatozoides anormales en el eyaculado (Barroso et al., 2000, Sakkas et al., 2002, Sakkas et al., 1999a).

Las características principales de una célula apoptótica son la activación de las caspasas, un punto de no retorno en la muerte celular que determina la fragmentación del ADN, la reducción del potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la externalización de la fosfatidilserina (EPS) como resultado de la pérdida de la integridad de la membrana celular (Evenson et al., 2002, Tarozzi et al., 2007), proceso que finalmente permite el reconocimiento por los fagocitos para su eliminación.

Estudios realizados tanto en ratones (Rockett et al., 2001) como en humanos (Sakkas et al., 1999a) demuestran que la apoptosis desempeña un papel importante en la infertilidad masculina y contribuye muy probablemente al fracaso de las TRA, ya que existe la probabilidad de que algunos espermatozoides seleccionados para ser microinyectados presenten características apoptóticas, a pesar de su apariencia normal, lo que puede ser parcialmente responsable de las bajas tasas de fecundación e implantación y el aborto espontáneo tras estos tratamientos (Borini et al., 2006).

Activación de las caspasas

Las caspasas son un conjunto de proteínas pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas que participan en la cascada de señalización celular desencadenada en respuesta a señales proapoptóticas. Desde el punto de vista funcional las caspasas pueden actuar como iniciadoras (caspasas 8, 9 y 10) o como efectoras (caspasas 3, 6 y 7) (Bratton et al., 2000, Earnshaw et al., 1999).

La activación de las caspasas es un factor relevante en la muerte celular programada al inducir la lisis de proteínas celulares estructurales y, en un estadio más avanzado, roturas en la cadena de ADN con fragmentación de la misma (Enari et al., 1998). En concreto, la acción de la caspasa-3 (CP-3) induce la activación del complejo «desoxirribonucleasa activado por caspasas» (también llamada CAD), responsable de la degradación de la cromatina (Paasch et al., 2003). Su activación también se ha relacionado con la motilidad espermática en varones infértiles (Wang et al., 2003, Almeida et al., 2005) y la morfología espermática al observar un número significativamente mayor de espermatozoides con residuos citoplasmáticos y externalización de la fosfatidilserina (Paasch et al., 2001).

Reducción del potencial de membrana mitocondrial

Las mitocondrias son unos orgánulos que participan en diversas funciones celulares, y característicamente presentan su propio genoma circular, ADN mitocondrial y ribosomas específicos que permiten la síntesis de proteínas locales (St John et al., 2010). Su adecuada actividad en los espermatozoides es necesaria para soportar varios procesos, incluyendo la capacitación (Ferramosca y Zara, 2014), la producción de ATP (Du Plessis et al., 2015), la biosíntesis de hormonas

esteroides, la generación de niveles fisiológicos de oxígeno reactivo, la regulación del Ca^{2+} intracelular y fenómenos similares a la apoptosis (Amaral et al., 2013). Tienen la particularidad de que son especialmente sensibles a fenómenos proapoptóticos debido a su ubicación y compartimentación en la pieza intermedia (Grunewald et al., 2005).

Aunque las mitocondrias paternas se degradan dentro del cigoto, la funcionalidad mitocondrial (membrana y PMM) es de gran importancia para una fecundación exitosa. De hecho, cambios en la integridad/funcionalidad mitocondrial como defectos en la ultraestructura o en su genoma, así como bajo potencial de membrana o consumo alterado de oxígeno, se han correlacionado con la pérdida de la función espermática (particularmente con disminución de la motilidad) (Evenson et al., 1982, Fleisch y Gadella, 2000). Es por esta razón que su alteración es considerada un marcador clave de la cascada de apoptosis (Barroso et al., 2006) y presenta además una correlación positiva con niveles de fragmentación de ADN espermático en humanos (Troiano et al., 1998).

Externalización de la fosfatidilserina

El fosfolípido fosfatidilserina (PS) es una molécula localizada en la cara citosólica de la membrana plasmática que, durante el proceso de apoptosis celular, migra hacia la superficie actuando *in vivo* como marcador para la destrucción por parte de los fagocitos, constituyéndose así como uno de los primeros fenómenos que se producen durante la apoptosis celular (Vermes et al., 1995). Algunos autores han propuesto que la apoptosis en los espermatozoides eyaculados es el resultado de un fallo espermatogénico (Sakkas et al., 2002, Sakkas et al., 1999a) y por tanto un proceso apoptótico abortivo que ha iniciado antes de la eyaculación (Cayli et al., 2004).

Otros autores, sin embargo, han hallado que los espermatozoides maduros eyaculados pueden externalizar la PS en otros procesos celulares, como la modificación de la membrana plasmática debido a la capacitación y/o reacción acrosómica (De Vries et al., 2003, Gadella y Harrison 2002, Martin et al., 2005) y también en procesos inflamatorios (Aitken et al., 1992, Lessig et al., 2007) o como resultado de su exposición a bacterias (Villegas et al., 2005).

Selección espermática en técnicas de reproducción asistida

En la actualidad varias técnicas de preparación de espermatozoides son utilizadas como componentes principales de los procedimientos en los TRA. El principal objetivo para emplear estas técnicas es generar la capacitación espermática, que es el conjunto de modificaciones moleculares y fisiológicas que experimentan los espermatozoides de forma natural en las proximidades del ovocito, y que les confieren su capacidad fecundante, y así obtener un número suficiente de espermatozoides móviles viables capaces de fecundar el ovocito.

Las técnicas estándares actuales de preparación de espermatozoides dependen de un enfoque de sedimentación (gradientes de densidad) o migración (*swim-up*) para separarlos basándose en su motilidad (Salicioni et al., 2007)

y son altamente efectivas en la reducción de la fragmentación espermática previo al ICSI (Rawe et al., 2010), pero son incapaces de detectar características ultraestructurales relacionadas con la apoptosis o la integridad del ADN (Cayli et al., 2004, Said et al., 2008, Henkel, 2012). De hecho, se ha podido establecer que cerca del 30% de los espermatozoides, después de someterse a los gradientes de densidad, se encuentran en estado apoptótico tardío o necrótico (De Vantery Arrighi et al., 2009), lo que puede afectar negativamente a los resultados finales.

Así pues, y con el objetivo de seleccionar los espermatozoides más competentes, en los últimos años se han introducido diferentes estrategias que van desde el uso de antioxidantes previo a un ciclo de microinyección espermática (ICSI) (Greco et al., 2005), la utilización de espermatozoides obtenidos a nivel testicular (Ramos et al., 2004) o la identificación de las causas del daño del ADN espermático que permitan reducir el número de espermatozoides apoptóticos. Con el mismo objetivo se ha intentado complementar con otras técnicas que, además de brindar información adicional, no impliquen la destrucción celular. Entre ellas encontramos la selección morfológica de los espermatozoides, que se basa en la evaluación microscópica de la morfología espermática y ha mostrado su eficacia en casos de fallo de implantación (Boitrelle et al., 2014); el aislamiento de espermatozoides maduros mediante la prueba de unión al ácido hialurónico, aunque hasta la fecha presenta un valor clínico limitado y no ha presentado una fuerte correlación con el desarrollo embrionario (Nijs et al., 2010, Sakkas et al., 2004) o la selección de espermatozoides mediante separación magnética (MACS) que aísla aquellos que expresan marcadores de apoptosis celular, como es la externalización del fosfolípido fosfatidilserina.

Separación magnética de células activadas en técnicas de reproducción asistida

La calidad tanto a nivel genético como bioquímico es altamente relevante a la hora de evaluar la competencia espermática. Aunque algunos autores sugieren que el espermatozoide con alteración en su ADN es capaz de fecundar, y que sus consecuencias no se hacen evidentes hasta que el embrión se ha dividido (Sakkas et al., 2004, Bungum et al., 2007, Gandini, Lombardo et al., 2004), ya se ha comentado que son muchas las alteraciones que pueden condicionar la viabilidad espermática y pueden condicionar en gran medida el éxito de estos tratamientos, no solo en cuanto a tasas de fecundación se refiere, sino también en lo referente al desarrollo embrionario y la obtención de la gestación.

Las alteraciones más notables, cuya extensión está íntimamente relacionada con la función espermática y la fertilidad masculina, son las que afectan a la integridad del ADN (Sakkas et al., 1999b), a sus niveles de fragmentación, a la presencia de grandes cantidades de especies del oxígeno reactivas y apoptosis espermática, así como la expresión de los marcadores propios de la muerte celular programada (Seli et al., 2004, Barroso et al., 2006, Henkel et al., 2004, Host et al., 2000b, Delbes et al., 2013, Host et al., 2000a).

Por tanto, las actuales tasas subóptimas de éxito en TRA pueden atribuirse, al menos en parte, a la inclusión

de espermatozoides con características no completamente adecuadas y romper las barreras de selección *in vivo* en la selección espermática. Esta hipótesis ha generado la motivación para desarrollar nuevos protocolos de selección espermática basados en la presencia de marcadores y manifestaciones de apoptosis, es decir, que incluyan características moleculares, además de las propiedades físicas.

Una de las técnicas introducidas en la práctica clínica se centra en la PS, la cual presenta alta afinidad por la anexina V, una proteína de unión a fosfolípidos que es incapaz de atravesar la membrana plasmática intacta del espermatozoide (Van Heerde et al., 1995). Por lo tanto su unión a la PS en la superficie espermática nos indica que la integridad de la membrana plasmática se encuentra comprometida tal y como se ha descrito con anterioridad y, como consecuencia de todo ello, puede estar reducida su capacidad fecundante (Glander y Schaller 1999, Deng y Lin 2012).

La aplicación de las MACS ha mostrado ser efectiva, incrementando las tasas de gestación al optimizar el procesamiento de la muestra espermática en parejas con infertilidad inexplicada (Makker et al., 2008, Gil et al., 2013, Lee et al., 2010).

Otros autores han evidenciado una reducción en la presencia de marcadores apoptóticos, fragmentación de ADN e incluso aneuploidías en espermatozoides de pacientes normozoospermicos, como lo demuestra un estudio realizado en 6 muestras seminales analizadas por *hibridación in situ fluorescente* cuando son comparadas con muestras seminales a las que solo se aplica el tratamiento estándar (Vendrell et al., 2014).

La separación magnética de células activadas también se ha mostrado eficaz en la reducción de la fragmentación del ADN espermático en pacientes con varicocele (Degheidy et al., 2015), y cuando se realiza de forma complementaria a la preparación seminal previo a técnicas de TRA (Bucar et al., 2015, Dirican et al., 2008, Polak de Fried y Denaday 2010, Zhang et al., 2017), de hecho, se ha logrado una disminución hasta del 70% de espermatozoides con EPS, un 60% en aquellos con alteración del PMM y un incremento medio del 50% en la supervivencia espermática (De Vantery Arrighi, Lucas et al., 2009).

En este sentido, y mediante un estudio prospectivo en el que analizaron la normalidad espermática, la fragmentación del ADN, el déficit de protaminas en la cromatina espermática, la externalización de la fosfatidilserina y la actividad de la caspasa-3 en las muestras de 50 varones, los autores concluyen, en primer lugar, que la técnica de gradientes de densidad es más efectiva que MACS al separar espermatozoides con ADN y cromatina íntegra, pero no para aislar espermatozoides con actividad de la caspasa-3 y, en segundo lugar, que el uso combinado de ambos procedimientos (gradiente de densidad y MACS, en este orden) permite obtener mejores índices de calidad espermática (Tavalaee et al., 2012).

Sin embargo, existen resultados que, aunque contradictorios, evalúan las consecuencias que la selección por MACS tiene sobre la motilidad espermática. Mientras algunos autores han detectado una reducción (Degheidy et al., 2015, Nadalini et al., 2014, Cakar et al., 2016) (Lee et al., 2010) otros obtienen una mejoría de la misma cuando se compara con las muestras previas a la aplicación de esta técnica (Said et al., 2005). De igual manera, su utilidad no parece tan

clara en los ciclos con donación de ovocitos. El grupo de Romany (Romany et al., 2014) concluye que la selección de espermatozoides que expresan la EPS no mejora los resultados de estos ciclos, y que la potencia metabólica de ovocitos jóvenes puede ser suficiente para reparar el daño del ADN.

Aun así, y teniendo en cuenta estas controversias, parece que hay una evidencia consistente sobre la utilidad de las MACS a nivel molecular, por lo que puede considerarse como complemento a la preparación convencional de la muestra espermática (Delbes et al., 2013) y podría ser una herramienta de utilidad para mejorar la calidad espermática en muestras crioconservadas de pacientes con cáncer, mejorando así el resultado de ICSI (Herrero, Delbes et al., 2013).

Conclusión

Diversos estudios han demostrado que los espermatozoides eyaculados presentan cambios asociados con la apoptosis. En particular la EPS, disminución de la integridad de PMM, fragmentación del ADN y la expresión de una serie de proteínas pro y antiapoptóticas.

Lamentablemente, y aunque en las últimas décadas las técnicas para la preparación seminal y selección espermática previo a las técnicas de reproducción asistida han avanzado, estas no tienen la capacidad de eliminar todos los espermatozoides con características apoptóticas, lo que condiciona el éxito de la fecundación *in vitro* y ha impulsado la mejora de estos protocolos.

Hasta la fecha, gracias a su fácil implementación y a la evidencia clínica que se está acumulando sobre el uso de la técnica de columnas de anexina v o MACS en los procedimientos de rutina del laboratorio de fecundación *in vitro* para la selección de espermatozoides no apoptóticos, se puede considerar como la única técnica que, además de complementar los protocolos convencionales de preparación seminal, puede mejorar las tasas de éxito de TRA.

Serían recomendables más estudios para evaluar los riesgos potenciales que puedan derivarse del empleo de las microperlas magnéticas de anexina v y para demostrar si su eficacia se mantiene en los ciclos con ovocitos procedentes de donación.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Bibliografía

- Aitken, R.J., Buckingham, D., West, K., Wu, F.C., Zikopoulos, K., Richardson, D.W., 1992. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *Journal of Reproduction and Fertility* 94, 451–462.
- Almeida, C., Cardoso, M.F., Sousa, M., Viana, P., Goncalves, A., Silva, J., et al., 2005. Quantitative study of caspase-3 activity in semen and after swim-up preparation in relation to sperm quality. *Human Reproduction (Oxford, England)* 20, 1307–1313.
- Amaral, A., Lourenco, B., Marques, M., Ramalho-Santos, J., 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction (Cambridge, England)* 146, R163–R174.
- Balasuriya, A., Speyer, B., Serhal, P., Doshi, A., Harper, J.C., 2011. Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa. *Reproductive biomedicine online* 22, 428–436.
- Barroso, G., Morshedi, M., Oehninger, S., 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction (Oxford, England)* 15, 1338–1344.
- Barroso, G., Taylor, S., Morshedi, M., Manzur, F., Gavino, F., Oehninger, S., 2006. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: A comparison of two different sperm subpopulations. *Fertility and Sterility* 85, 149–154.
- Boitrelle, F., Guthauser, B., Alter, L., Bailly, M., Bergere, M., Wainer, R., et al., 2014. High-magnification selection of spermatozoa prior to oocyte injection: Confirmed and potential indications. *Reproductive Biomedicine Online* 28, 6–13.
- Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M.A., Fava, L., Flamigni, C., et al., 2006. Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction (Oxford, England)* 21, 2876–2881.
- Bratton, S.B., Macfarlane, M., Cain, K., Cohen, G.M., 2000. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Experimental Cell Research* 256, 27–33.
- Bronet, F., Martinez, E., Gaytan, M., Linan, A., Cernuda, D., Ariza, M., et al., 2012. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Human Reproduction (Oxford, England)* 27, 1922–1929.
- Bucar, S., Goncalves, A., Rocha, E., Barros, A., Sousa, M., Sa, R., 2015. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32, 147–154.
- Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J., et al., 2007. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction (Oxford, England)* 22, 174–179.
- Cakar, Z., Cetinkaya, B., Aras, D., Koca, B., Ozkavukcu, S., Kaplanoglu, I., et al., 2016. Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 33, 1059–1065.
- Cayli, S., Sakkas, D., Vigue, L., Demir, R., Huszar, G., 2004. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: Creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Molecular human reproduction* 10, 365–372.
- De Vantery Arrighi, C., Lucas, H., Chardonens, D., de Agostini, A., 2009. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 7, 1-7827-7-1.

- De Vries, K.J., Wiedmer, T., Sims, P.J., Gadella, B.M., 2003. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biology of Reproduction* 68, 2122–2134.
- Degheidy, T., Abdelfattah, H., Seif, A., Albuz, F.K., Gazi, S., Abbas, S., 2015. Magnetic activated cell sorting: an effective method for reduction of sperm DNA fragmentation in varicocele men prior to assisted reproductive techniques. *Andrologia* 47, 892–896.
- Delbes, G., Herrero, M.B., Troeung, E.T., Chan, P.T., 2013. The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. *Andrology* 1, 698–706.
- Deng, X.L., Lin, F.Q., 2012. Magnetic activated cell sorting and its application in the studies of male infertility. *Zhonghua Nan Ke Xue=National Journal of Andrology* 18, 70–73.
- Dirican, E.K., Ozgun, O.D., Akarsu, S., Akin, K.O., Ercan, O., Ugurlu, M., et al., 2008. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 25, 375–381.
- Du Plessis, S.S., Agarwal, A., Mohanty, G., van der Linde, M., 2015. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: What fuel do spermatozoa use? *Asian Journal of Andrology* 17, 230–235.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., 1999. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68, 383–424.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S., 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43–50.
- Enciso, M., Alfarawati, S., Wells, D., 2013. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Human Reproduction (Oxford, England)* 28, 1707–1715.
- Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M., Giwercman, A., 2006. Sperm chromatin structure and male fertility: Biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology* 8, 11–29.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R., 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 30, 279–280.
- Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost, L.K., 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* 23, 25–43.
- Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G., Foresta, C., 2007. Male infertility: Role of genetic background. *Reproductive Biomedicine Online* 14, 734–745.
- Ferramosca, A., Zara, V., 2014. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *BioMed Research International*, 902953, 2014.
- Flesch, F.M., Gadella, B.M., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469, 197–235.
- Gadella, B.M., Harrison, R.A., 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction* 67, 340–350.
- Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caruso, F., Eleuteri, P., Leter, G., et al., 2004. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Human reproduction (Oxford, England)* 19, 1409–1417.
- Garcia-Herrero, S., Garrido, N., Martinez-Conejero, J.A., Remohi, J., Pellicer, A., Meseguer, M., 2011. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reproductive Biomedicine Online* 22, 25–36.
- Gil, M., Sar-Shalom, V., Melendez Sivira, Y., Carreras, R., Checa, M.A., 2013. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 30, 479–485.
- Giwercman, A., Lindstedt, L., Larsson, M., Bungum, M., Spano, M., Levine, R.J., et al., 2010. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: A case-control study. *International Journal of Andrology* 33, e221–e227.
- Glander, H.J., Schaller, J., 1999. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: A rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Molecular Human Reproduction* 5, 109–115.
- Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., et al., 2005. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human reproduction (Oxford, England)* 20, 226–230.
- Grunewald, S., Paasch, U., Said, T.M., Sharma, R.K., Glander, H.J., Agarwal, A., 2005. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertility and Sterility* 83 (Suppl 1), 1106–1112.
- Hassold, T., Hall, H., Hunt, P., 2007. The origin of human aneuploidy: Where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics* 16, R203–R208.
- Henkel, R., 2012. Sperm preparation: state-of-the-art-physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian Journal of Andrology* 14, 260–269.
- Henkel, R., Hajimohammad, M., Staf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., et al., 2004. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility* 81, 965–972.
- Herrero, M.B., Delbes, G., Chung, J.T., Son, W.Y., Holzer, H., Buckett, W., et al., 2013. Case report: The use of annexin V coupled with magnetic activated cell sorting in cryopreserved spermatozoa from a male cancer survivor: Healthy twin newborns after two previous ICSI failures. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 30, 1415–1419.
- Host, E., Lindenberg, S., Smidt-Jensen, S., 2000a. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 79, 189–193.
- Host, E., Lindenberg, S., Smidt-Jensen, S., 2000b. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 79, 559–563.
- Jackson, R.E., Bormann, C.L., Hassun, P.A., Rocha, A.M., Motta, E.L., Serafini, P.C., et al., 2010. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility* 94, 2626–2630.
- Larson, K.L., Dejonge, C.J., Barnes, A.M., Jost, L.K., Evenson, D.P., 2000. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human reproduction (Oxford, England)* 15, 1717–1722.
- Lee, T.H., Liu, C.H., Shih, Y.T., Tsao, H.M., Huang, C.C., Chen, H.H., et al., 2010. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)* 25, 839–846.
- Lessig, J., Spalteholz, H., Reibetanz, U., Salavei, P., Fischlechner, M., Glander, H.J., et al., 2007. Myeloperoxidase binds to non-vital spermatozoa on phosphatidylserine epitopes. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 12, 1803–1812.
- Lo, C.C., Thompson, J.A., Lowry, V.K., Varner, D.D., 2002. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology* 57, 1135–1142.

- Makker, K., Agarwal, A., Sharma, R.K., 2008. Magnetic activated cell sorting (MACS): Utility in assisted reproduction. *Indian Journal of Experimental Biology* 46, 491–497.
- Martin, G., Sabido, O., Durand, P., Levy, R., 2005. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: Relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Human Reproduction (Oxford, England)* 20, 3459–3468.
- Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosalvez, J., Alvarez, J.G., Fernandez, J.L., 2007. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *Journal of Andrology* 28, 38–49.
- Nadalini, M., Tarozzi, N., di Santo, M., Borini, A., 2014. Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: Is the new approach better than the traditional one? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31, 1045–1051.
- Nakamura, Y., Kitamura, M., Nishimura, K., Koga, M., Kondoh, N., Takeyama, M., et al., 2001. Chromosomal variants among 1790 infertile men. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association* 8, 49–52.
- Nicolaidis, P., Petersen, M.B., 1998. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Human Reproduction (Oxford, England)* 13, 313–319.
- Nijs, M., Creemers, E., Cox, A., Janssen, M., Vanheusden, E., Van Der Elst, J., et al., 2010. Relationship between hyaluronic acid binding assay and outcome in ART: A pilot study. *Andrologia* 42, 291–296.
- Paasch, U., Grunewald, S., Wuendrich, K., Glander, H.J., 2001. Caspases are associated with apoptosis in human ejaculated spermatozoa and in spermatogenesis. *American Society of Andrology* 22, 91.
- Paasch, U., Grunewald, S., Fitzl, G., Glander, H.J., 2003. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *Journal of Andrology* 24, 246–252.
- Polak de Fried, E., Denaday, F., 2010. Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertility and Sterility* 94, 351.e15–351.e18.
- Rajeev, S.K., Reddy, K.V., 2004. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: Identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Human Reproduction (Oxford, England)* 19, 234–242.
- Ramos, L., de Boer, P., Meuleman, E.J., Braat, D.D., Wetzels, A.M., 2004. Chromatin condensation and DNA damage of human epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Reproductive Biomedicine Online* 8, 392–397.
- Rawe, V.Y., Boudri, H.U., Alvarez Sedo, C., Carro, M., Papier, S., Nodar, F., 2010. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reproductive Biomedicine Online* 20, 320–323.
- Rockett, J.C., Mapp, F.L., Garges, J.B., Luft, J.C., Mori, C., Dix, D.J., 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of Reproduction* 65, 229–239.
- Romany, L., Garrido, N., Motato, Y., Aparicio, B., Remohi, J., Meseguer, M., 2014. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertility and Sterility* 102, 1567–1575.e1.
- Said, T.M., Agarwal, A., Zborowski, M., Grunewald, S., Glander, H.J., Paasch, U., 2008. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *Journal of Andrology* 29, 134–142.
- Said, T.M., Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H.J., Baumann, T., Kriegel, C., et al., 2005. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reproductive Biomedicine Online* 10, 740–746.
- Sakkas, D., Alvarez, J.G., 2010. Sperm DNA fragmentation: Mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility* 93, 1027–1036.
- Sakkas, D., Mariethoz, E., St John, J.C., 1999a. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Experimental Cell Research* 251, 350–355.
- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P.G., Bianchi, U., 1999b. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction* 4, 31–37.
- Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G.C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., Bizzaro, D., 2002. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction* 66, 1061–1067.
- Sakkas, D., Seli, E., Manicardi, G.C., Nijs, M., Ombelet, W., Bizzaro, D., 2004. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: Did apoptosis fail? *Human Fertility (Cambridge, England)* 7, 99–103.
- Salicioni, A.M., Platt, M.D., Wertheimer, E.V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., et al., 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 65, 245–259.
- Schlegel, P.N., 2009. Evaluation of male infertility. *Minerva Ginecologica* 61, 261–283.
- Seli, E., Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Moffatt, O., Sakkas, D., 2004. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 82, 378–383.
- Sinawat, S., 2000. The environmental impact on male fertility. *Journal of the Medical Association of Thailand=Chotmaihet thangphaet* 83, 880–885.
- St John, J.C., Facucho-Oliveira, J., Jiang, Y., Kelly, R., Salah, R., 2010. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: A journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update* 16, 488–509.
- Tarozzi, N., Bizzaro, D., Flamigni, C., Borini, A., 2007. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reproductive Biomedicine Online* 14, 746–757.
- Tavalae, M., Deemeh, M.R., Arbabian, M., Nasr-Esfahani, M.H., 2012. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: Which technique is more useful for clinical sperm selection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 29, 31–38.
- Tavalae, M., Razavi, S., Nasr-Esfahani, M.H., 2009. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility* 91, 1119–1126.
- Troiano, L., Granata, A.R., Cossarizza, A., Kalashnikova, G., Bianchi, R., Pini, G., et al., 1998. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Experimental Cell Research* 241, 384–393.
- Van Heerde, W.L., de Groot, P.G., Reutelingsperger, C.P., 1995. The complexity of the phospholipid binding protein annexin V. *Thrombosis and haemostasis* 73, 172–179.
- Vendrell, X., Ferrer, M., Garcia-Mengual, E., Munoz, P., Trivino, J.C., Calatayud, C., et al., 2014. Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reproductive Biomedicine Online* 28, 492–502.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184, 39–51.

- Villegas, J., Schulz, M., Soto, L., Sanchez, R., 2005. [Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death](#) 10, 105–110.
- Wang, X., Sharma, R.K., Sikka, S.C., Thomas Jr., A.J., Falcone, T., Agarwal, A., 2003. [Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. Fertility and Sterility](#) 80, 531–535.
- World Health Organization,; Department of Reproductive Health and Research. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed; 2010.
- Zhang, H., Xuan, X., Yang, S., Li, X., Xu, C., Gao, X., 2017. [Selection of viable human spermatozoa with low levels of DNA fragmentation from an immotile population using density gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting. Andrologia.](#)
- Zini, A., Sigman, M., 2009. [Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. Journal of Andrology](#) 30, 219–229.