

# Fragmentación del ADN reducida en una población de espermatozoides seleccionados por la progesterona y su potencial uso en medicina reproductiva

## *Reduced DNA fragmentation in sperm population selected by progesterone and its potential use in reproductive medicine*

Biol. Ignacio A. Moreno<sup>1</sup>, Lic. Diego R. Uñates<sup>1</sup>, Dra. María M. Montesinos<sup>1</sup>, Dra. Laura V. Gatica<sup>1</sup>, Dr. Héctor A. Guidobaldi<sup>1</sup>, Dra. María E. Teves<sup>1</sup>, Bioq. Rosa Molina<sup>2</sup>, Dra. Laura C. Giojalas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarsfield 1611 (X5016GCA) Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup> LAR, Laboratorio de Andrología y Reproducción, Bv. Chacabuco 1123 PB (X5000III) Córdoba, Argentina.

Dra. Laura C. Giojalas, Av. Vélez Sarsfield 1611, (X5016GCA) Córdoba, Argentina.

TE: 54-0351-433-4141, ext. 402 - Fax: 0054-0351-433-4119 - E-mail: lcgiojalas@com.uncor.edu

### Resumen

**Introducción:** recientemente, en nuestro laboratorio, hemos desarrollado un método denominado "ESE" (Ensayo de Selección Espermática; Patente en trámite), que selecciona y concentra los espermatozoides capacitados sobre la base del movimiento quimiotáctico hacia la progesterona. Por otra parte, la fragmentación del ADN espermático tiene una influencia negativa en el resultado de la fecundación asistida. **Objetivo:** evaluar el nivel de fragmentación del ADN en la población de espermatozoides seleccionada con el ESE. **Metodología:** la proporción de espermatozoides con el ADN fragmentado se evaluó mediante la técnica de "Comet Assay" en diferentes poblaciones espermáticas: antes de la capacitación, después de la selección con el "ESE" en presencia o ausencia de progesterona. **Resultados y conclusiones:** el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado antes de la capacitación fue del  $27\% \pm 5\%$ , valor que se elevó significativamente después de la capacitación espermática ( $62\% \pm 6\%$ ). Este valor se mantuvo constante en la población espermática que pasó por la cámara del ESE en ausencia de progesterona ( $60\% \pm 7\%$ ). Por el contrario, en presencia de progesterona, la proporción de espermatozoides con el ADN fragmentado se redujo significativamente a valores similares a los observados antes de la capacitación ( $32\% \pm 7\%$ ). Estos resultados sugieren que la selección espermática con el ESE en presencia de progesterona, no solo selecciona y concentra los espermatozoides capacitados, sino que también reduce significativamente la proporción de espermatozoides con el ADN fragmentado. El uso de esta población espermática podría mejorar significativamente el resultado de las técnicas de fecundación asistida, especialmente en la aplicación de ICSI.

**Palabras clave:** espermatozoides, progesterona, quimiotaxis, fragmentación del ADN.

### Summary

**Introduction:** Recently, we developed a method called "SSA" (Sperm Selection Assay; patent pending) to select and concentrate capacitated spermatozoa by means of the chemotactic orientation towards progesterone. On the other hand, sperm DNA fragmentation negatively affects assisted fertilization. **Aim:** To determine the level of DNA fragmentation in the sperm population selected by the SSA. **Methodology:** The proportion of spermatozoa showing DNA fragmentation was determined by means of the "Comet Assay" technique in different sperm populations: before capacitation, after capacitation and after SSA with or without progesterone. **Results and conclusions:** The percentage of spermatozoa with DNA fragmentation before capacitation was  $27\% \pm 5\%$ , value that was significantly increased after sperm capacitation ( $62\% \pm 6\%$ ). This parameter was not modified when spermatozoa passed through the SSA in the absence of progesterone. On the contrary, in the presence of this steroid, the SSA allowed to significantly reduce the percentage of spermatozoa with DNA fragmentation at the same extent observed previous to sperm capacitation ( $32\% \pm 7\%$ ). These results suggest that the sperm selection made with the SSA in the presence of progesterone not only selects and concentrates those capacitated spermatozoa but also reduces the percentage of spermatozoa with DNA fragmentation. The use of this sperm population may significantly improve the result of assisted reproduction techniques, especially in the cases where ICSI is applied. **Keywords:** spermatozoa, progesterone, chemotaxis, DNA fragmentation.

## Introducción

La infertilidad es un fenómeno que se observa a nivel global y que afecta a casi 70 millones de parejas en todo el mundo, donde aproximadamente un tercio de los casos se deben al factor masculino, es decir, la imposibilidad del espermatozoide de fecundar un ovocito<sup>1</sup>. En los últimos 40 años, se han desarrollado diversas técnicas de reproducción asistida con el fin de superar la infertilidad. A nivel mundial, se practican más de un millón de estos tratamientos por año, donde solo el 30% de las parejas logra tener un bebé, mientras que el 70% restante vuelve a intentarlo una o más veces<sup>2</sup>. Estas estadísticas señalan que si bien las técnicas de reproducción asistida han posibilitado el nacimiento de niños que bajo condiciones naturales hubiese sido imposible, aún es necesario perfeccionar las técnicas existentes y/o generar innovaciones que ayuden a incrementar el número de tratamientos exitosos.

A nivel mundial, la técnica de ICSI (inyección de un espermatozoide dentro de un ovocito) es la más utilizada para el tratamiento de la pareja infértil<sup>2</sup>. Aunque esta técnica permitió mejorar la tasa de fecundación artificial, la tasa de embarazo no difiere de la obtenida con la fecundación *in vitro*<sup>2</sup>. Esto podría deberse a que la selección artificial del espermatozoide evita las barreras naturales de selección que normalmente ocurren dentro del aparato reproductor femenino. Además, dicha selección artificial del mejor espermatozoide actualmente se basa en criterios que analizan la morfología y la movilidad espermática, parámetros que no necesariamente reflejan el buen estado fisiológico del espermatozoide. De hecho, las muestras de pacientes con “esterilidad sin causa aparente” presentan espermograma normal pero suelen manifestar una aptitud fisiológica disminuida<sup>3-6</sup>.

Aparentemente, hay dos características fisiológicas del espermatozoide que condicionarían el éxito de la fecundación y el posterior desarrollo embrionario. Una de ellas es la capacitación espermática, ya que sólo los espermatozoides que han completado este proceso pueden fecundar al ovocito<sup>7</sup>. La capacitación ocurre dentro del oviducto de la mujer y en forma previa a la fecundación<sup>8</sup>. La otra característica fisiológica es el grado de fragmentación del ADN del espermatozoide, donde un nivel de fragmentación elevado conduce a una disminución en la fertilidad<sup>9-11</sup> y también a alteraciones en el desarrollo del embrión<sup>12,13</sup>.

Por lo tanto, al momento de seleccionar el mejor espermatozoide para ICSI, sería importante contar con una población celular enriquecida con los mejores espermatozoides desde el punto de vista fisiológico (aquellos que están “capacitados” y que no tienen dañado su ADN), y así aumentar las posibilidades de lograr una fecundación y un desarrollo embrionario normal.

Recientemente se han desarrollado dos técnicas de selección de espermatozoides para ICSI. Una de ellas permite obtener una población de espermatozoides “maduros”<sup>14-16</sup> (aquellos que completaron exitosamente la espermiogénesis dentro del testículo), por lo tanto, no considera el estado de capacitación espermática. La otra técnica proporciona una población de espermatozoides con baja incidencia de la fragmentación del ADN<sup>17,18</sup>. Este último método se basa en la remoción de los espermatozoides que externalizan fosfatidilserina en la membrana plasmática, pero esta característica no solo identifica las células que tienen el ADN dañado, sino también aquellas que están “capacitadas”<sup>19</sup>. Por lo tanto, ninguno de estos métodos garantiza una buena proporción de espermatozoides “capacitados”.

En nuestro laboratorio, el estudio que realizamos durante los últimos diez años sobre la quimiotaxis espermática (orientación del espermatozoide hacia el encuentro con el ovocito<sup>20</sup>) nos permitió recientemente diseñar un método con el potencial para mejorar los resultados de las técnicas de reproducción asistida. Este método denominado “ESE” (Ensayo de Selección Espermática) selecciona y concentra los mejores espermatozoides (los capacitados) tanto en muestras de semen normal como subfértiles<sup>21,22</sup> (Patente nacional e internacional tramitada por CONICET). Aunque se sabe que sólo los espermatozoides capacitados pueden fecundar al ovocito<sup>23</sup>, es necesaria una evaluación más exhaustiva de la calidad de la subpoblación espermática aislada con el ESE.

Teniendo en cuenta la importancia que tiene el nivel de fragmentación del ADN en el éxito de la fecundación y en el desarrollo normal, y que el ESE selecciona y concentra los espermatozoides en el mejor estado fisiológico para fecundar al ovocito, sería interesante verificar si esta población espermática presenta baja incidencia de daño en el ADN. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue verificar si la selección espermática mediada por quimiotaxis hacia progesterona con el método ESE permitía obtener una población enriquecida con espermatozoides capacitados y con menor proporción de espermatozoides con el ADN fragmentado, en muestras de semen normales y subfértiles. Los resultados esperados podrían contribuir a mejorar el tratamiento de la pareja infértil.

## Materiales y métodos

### *Diseño experimental*

Teniendo en cuenta que solo en presencia de progesterona se seleccionan los espermatozoides capacitados con el ESE y que el nivel de fragmentación del ADN suele aumentar durante la capacitación espermática<sup>24</sup>, el estudio se llevó a cabo en las siguientes poblaciones espermáticas: 1) espermatozoides sin capacitar, antes del

*ESE*; 2) espermatozoides capacitados, antes del *ESE*; 3) espermatozoides capacitados, después del *ESE* en ausencia de progesterona; y 4) espermatozoides capacitados, después del *ESE* en presencia de progesterona. En estas cuatro poblaciones espermáticas se determinaron los siguientes parámetros: fragmentación del ADN, capacitación y morfología normal. Este diseño experimental se llevó a cabo en muestras de semen normales y subfértiles.

### Crterios de clasificacin de las muestras de semen

Los experimentos se realizaron con muestras de semen de individuos normales y subfértiles (teratozoospermicos), provistas por el Laboratorio de Andrología y Reproducción (LAR, Córdoba). Las muestras se clasificaron teniendo en cuenta los valores de referencia actualizados por la Organizacin Mundial de la Salud para semen humano<sup>25,26</sup>. El criterio de normalidad se determinó sobre la base del percentilo 25 de los valores poblacionales y la muestra se consideró como normal cuando la concentracin, movilidad y morfología normal (determinados en el semen) eran iguales o superiores a  $41 \times 10^6$  células/ml, 53% y 9%, respectivamente. Una muestra se consideró teratozoospermica cuando el porcentaje de morfología normal era inferior al 9%.

### Preparacin de los espermatozoides

Los espermatozoides se separaron del plasma seminal a través de un gradiente discontinuo de Percoll<sup>27</sup>. La fraccin de espermatozoides móviles se incubó bajo condiciones capacitantes con medio HAM-F10 (que contenía 25 mM Hepes y L-glutamina, Invitrogen, Argentina) suplementado con HSA al 1% (albúmina sérica humana, Laboratorio de Hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), por 4 horas a 37 °C, bajo una atmósfera de aire con el 5% de CO<sub>2</sub>. La evaluacin de la poblacin espermática no capacitada se realizó al final de la separacin del plasma seminal y en ausencia de HSA.

### Separacin espermática con el ESE

Las cámaras del *ESE* consisten en dos compartimientos unidos por un puente. En un compartimiento se colocaron los espermatozoides previamente capacitados, y en el otro, medio de cultivo con progesterona o sin ella (10 pM; Sigma-Aldrich, USA), ésta última formaba el gradiente de concentracin necesario para que las células se orientaran quimiotácticamente. La cámara así preparada se incubó durante 20 minutos a 37 °C, y a continuacin se retiró la poblacin espermática que migró hacia el compartimiento que contenía la progesterona.

### Fragmentacin del ADN

El grado de fragmentacin del ADN se evaluó con un kit comercial para realizar la técnica de “*Comet*

*assay*” (Trevigen, USA). Para ello, a cada poblacin espermática se le adicionó agarosa de bajo punto de fusin y posteriormente se sumergió en una solucin que degrada todo componente celular excepto el ADN (2,5 M de cloruro de sodio, 100 mM de EDTA pH 10, 10 mM de Tris Base, 1% de lauril sarcosina de sodio y 1% de tritón X-100). Luego, las muestras se trataron con una solucin alcalina (49,75 ml de agua tridestilada, 250 ml de EDTA 200 mM, y 0,6 g de hidróxido de sodio) para permitir el desenrollamiento completo de la doble hélice de ADN. A continuacin, las muestras se sometieron a una electroforesis horizontal (amperaje constante a 300 mA) durante 10 minutos para permitir la migracin de los fragmentos de ADN que pudiera contener la muestra<sup>28</sup>. Posteriormente, las células se tiñeron con SYBR-Green y se obtuvieron imágenes digitales con una cámara fotográfica *Nikon DS-Qi1* incorporada a un microscopio de fluorescencia *Nikon Ti-S*, mediante el software *NIS-elements Br v3.06*. Para cada poblacin espermática se fotografiaron 100 células elegidas al azar, que fueron analizadas con el software *Comet Score* versión 1.5, que permite determinar el nivel de fragmentacin del ADN. Cuando las células tienen el ADN dañado, los fragmentos de esta molécula migran durante la electroforesis entre los poros de la agarosa, mientras que el ADN no fragmentado no puede hacerlo. De esta manera, las células que tienen el ADN fragmentado adquieren un aspecto de cometa, formado por la cabeza (que contiene el ADN intacto) y la cola con los fragmentos pequeños de ADN<sup>29,30</sup>. Los resultados se expresaron como el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado según el criterio descrito por Hughes y cols.<sup>29</sup>, donde se considera que un espermatozoide tiene el ADN fragmentado cuando presenta menos del 80% del ADN en la cabeza del cometa. Adicionalmente, se calculó el índice de variacin (IV) en el porcentaje de espermatozoides (E) con el ADN fragmentado en la poblacin espermática seleccionada con el *ESE*, en comparacin con el nivel de fragmentacin que tenía la muestra de espermatozoides capacitados antes del *ESE*. Este índice se calculó según la siguiente fórmula:

$$IV = \frac{\% \text{ E ADN fragmentado Después del ESE}}{\% \text{ E ADN fragmentado Antes del ESE}}$$

### Capacitacin

En cada poblacin espermática se determinó el porcentaje de células que realizaron la reaccin acrosómica inducida, como un indicador del nivel de

espermatozoides capacitados<sup>31</sup>. Las distintas poblaciones espermáticas se incubaron en presencia o ausencia de un inductor farmacológico de la reacción acrosómica (A23187, 10  $\mu\text{M}^{31}$ ). A continuación, éstas se fijaron con formol al 2% (20 minutos a temperatura ambiente) y luego se lavaron con acetato de amonio 100 mM (7 minutos a 1600 rpm), dispersando el pellet sobre un portaobjetos. Los espermatozoides se tiñeron con el colorante Coomassie G250 por 10 minutos<sup>32</sup> y se observó el estado del acrosoma (intacto o reaccionado) en 200 células seleccionadas al azar, en un microscopio de campo claro a 1.000x. El porcentaje de espermatozoides capacitados se calculó como la diferencia en el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma reaccionado, en forma espontánea e inducida. Además se calculó el índice de variación (IV) en el porcentaje de espermatozoides (E) capacitados en la población espermática seleccionada con el ESE, en comparación con el porcentaje de espermatozoides capacitados que tenía la muestra antes del ESE, sobre la base de la siguiente fórmula:

$$IV = \frac{\% \text{ E capacitados Después del ESE}}{\% \text{ E capacitados Antes del ESE}}$$

**Morfología**

El análisis de la morfología se llevó a cabo en todas las poblaciones espermáticas mencionadas en el diseño experimental y, además, en un extendido del semen fresco. Para ello, una muestra de cada población celular se colocó en un portaobjetos y se dejó secar al aire. Las muestras se tiñeron según la técnica de Papanicolaou<sup>25</sup> y se evaluó la morfología celular con microscopía de campo claro a 1.000x según el criterio estricto de Kruger<sup>33</sup>. Los resultados se expresaron como el porcentaje de espermatozoides con morfología normal sobre la base de 200 células por muestra espermática.

**Análisis estadístico**

La diferencia entre los distintos tratamientos se estableció con el test “t”, previa transformación de los datos mediante la raíz cuadrada del arcoseno de la proporción, mediante el programa Infostat (Universidad Nacional de Córdoba). Las diferencias se consideraron significativas a un valor de  $p < 0,05$ .

**Resultados y discusión**

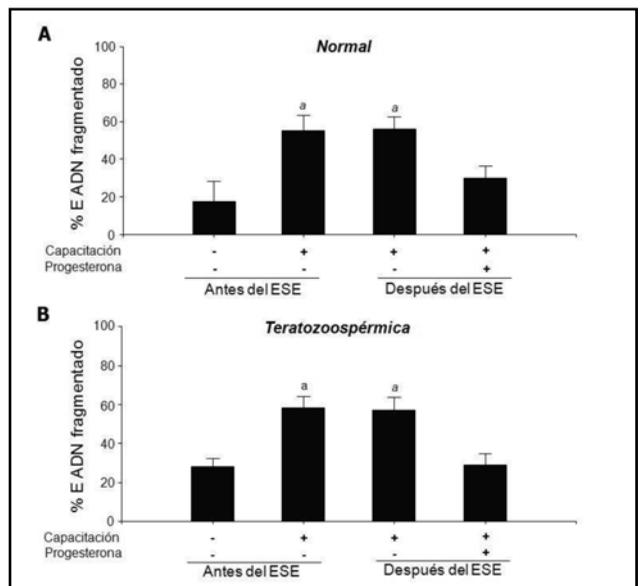
*Fragmentación del ADN*

En muestras de semen de pacientes infértiles se ha observado una alta incidencia de fragmentación en el ADN<sup>29</sup>. Por lo tanto, el nivel de espermatozoides con el ADN fragmentado se evaluó en las distintas poblaciones

espermáticas en muestras de semen normal y teratozoospermicas. Así, el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado varió significativamente en función de la población espermática analizada, tanto en las muestras normales como teratozoospermicas (Figura 1 AB), según se detalla a continuación.

Antes de la capacitación, en ambos tipos de muestras se observó  $\approx 20\%$  de espermatozoides con el ADN fragmentado. Estos valores son similares a los observados por otros autores, ya sea con la técnica de TUNEL<sup>34</sup> o con la técnica del *Comet Assay*<sup>29</sup>. El nivel de fragmentación del ADN espermático aumentó significativamente luego de 4 horas de incubación bajo condiciones capacitantes y alcanzó valores cercanos al 60%. Este aumento en la fragmentación del ADN era esperable, ya que durante la capacitación espermática aumenta significativamente el nivel de especies reactivas del oxígeno, conocidas como uno de los causantes del daño del ADN<sup>24</sup>. Un nivel bajo de especies reactivas del oxígeno tiene un efecto benéfico sobre los espermatozoides, ya que promueve la capacitación espermática, mientras que una cantidad excesiva de éstos puede provocar daño en el ADN<sup>24</sup>; se desconocen los valores del umbral que separa esta acción dual de las especies reactivas del oxígeno sobre la estructura del ADN.

Una vez capacitados, el pasaje de los espermatozoides a través del dispositivo del ESE en ausencia de progesterona, no modificó la proporción de espermatozoides con daño en el ADN. Sin embargo, cuando los espermatozoides capacitados se enfrentaron a un gra-

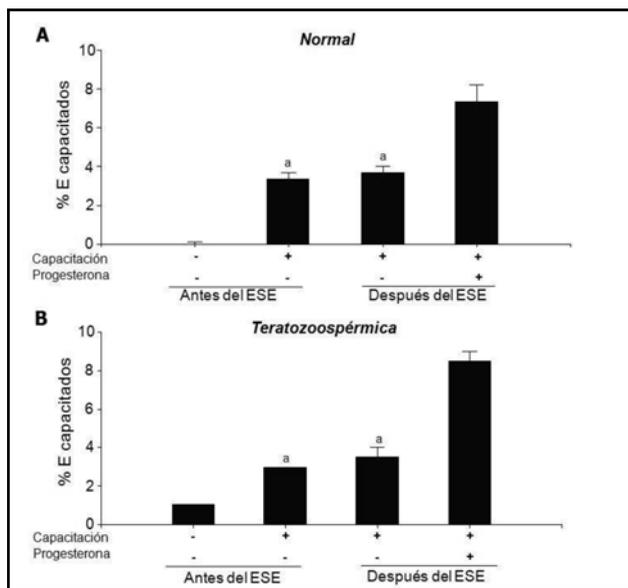


**Figura 1.** Porcentaje de espermatozoides (E) con el ADN fragmentado en las distintas poblaciones espermáticas de muestras de semen Normales (A) y Teratozoospermicas (B). <sup>a</sup> diferencias significativas vs. antes del ESE (sin capacitar) y después del ESE con progesterona ( $p < 0,05$ ).

diente de progesterona dentro del dispositivo del *ESE*, la población espermática seleccionada presentó una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN. Estos resultados muestran que el uso del *ESE* en presencia de progesterona permite obtener una población celular con reducida proporción de espermatozoides con el ADN fragmentado, tanto en muestras normales como teratozoospermicas. Por otra parte, en este trabajo se observó que las muestras de semen clasificadas como teratozoospermicas se comportan en forma similar a las normales en cuanto a la fragmentación del ADN. Estos resultados contradicen las observaciones realizadas por Hughes y cols.<sup>29</sup>, donde las muestras de pacientes subfértiles tenían un mayor nivel de daño en el ADN. Si bien en el presente trabajo se observó que el nivel de fragmentación del ADN en las muestras teratozoospermicas antes de la capacitación sería levemente mayor que en las muestras normales, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

### Capacitación espermática

Con el fin de detectar alguna posible relación entre la fragmentación del ADN y la capacitación espermática, se determinó la proporción de espermatozoides capacitados antes y después de aplicar el *ESE*, en ambos tipos de muestras (normales y teratozoospermicas). El porcentaje de espermatozoides capacitados varió significativamente en función de la población espermática analizada, tanto en muestras normales como teratozoospermicas (Figura 2 AB), según se detalla a continuación.



**Figura 2.** Porcentaje de espermatozoides (E) capacitados en las distintas poblaciones espermáticas de muestras de semen Normales (A) y Teratozoospermicas (B). <sup>a</sup> diferencias significativas vs. antes del ESE (sin capacitar) y después del ESE con progesterona ( $p < 0,05$ ).

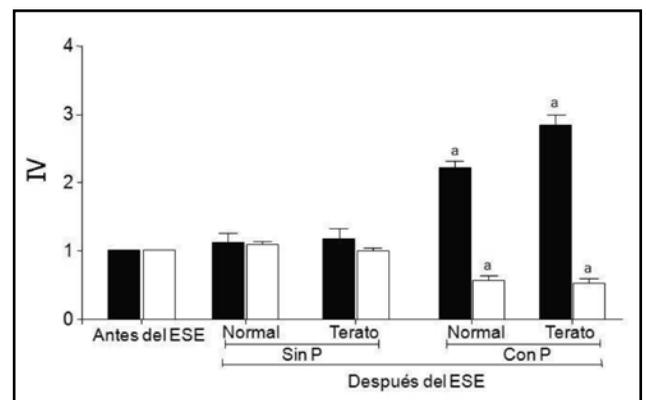
Al final de la separación del plasma seminal, la proporción de espermatozoides capacitados fue prácticamente nula. Luego de 4 horas de incubación bajo condiciones capacitantes, el nivel de espermatozoides capacitados aumentó significativamente. Este resultado es esperable ya que la capacitación espermática es un fenómeno tiempo-dependiente<sup>8</sup>. Cabe destacar que el nivel de espermatozoides capacitados se mantuvo estable cuando los espermatozoides pasaron a través del *ESE* en ausencia de progesterona. Por el contrario, este parámetro espermático aumentó significativamente cuando las células se seleccionaron con un gradiente de progesterona en el dispositivo del *ESE*. De esta manera, el uso del *ESE* permitió seleccionar y concentrar los espermatozoides capacitados tanto en muestras normales como teratozoospermicas.

Este resultado es coincidente con los datos obtenidos previamente con el *ESE*, donde se observó que solo en presencia de progesterona es posible seleccionar y concentrar los espermatozoides capacitados, en igual magnitud en las muestras de semen normales y teratozoospermicas<sup>21,22</sup>. Este hecho sugiere que, aun en el caso de una muestra con morfología espermática normal disminuida (p. ej., teratozoospermicas), sería posible seleccionar y concentrar aquellos espermatozoides que estén aptos fisiológicamente.

### Comparación de la variación en la capacitación y la fragmentación del ADN después del ESE

El IV en el nivel de espermatozoides capacitados y con el ADN fragmentado (Figura 3) se calculó con el fin de determinar la magnitud del cambio observado en estos parámetros como consecuencia del paso de los espermatozoides a través del *ESE* en presencia de progesterona.

Cuando los espermatozoides se pasaron por el *ESE* en ausencia de progesterona, el índice de variación



**Figura 3.** Índice de variación (IV) en la proporción de espermatozoides Capacitados (■) y con el ADN Fragmentado (□), en las distintas poblaciones espermáticas de muestras de semen Normales y Teratozoospermicas. <sup>a</sup> Diferencias significativas vs. antes del ESE y después del ESE sin progesterona, en cada tipo de muestra ( $p < 0,05$ ).

en estos dos parámetros espermáticos se mantuvo igual que antes de usar el *ESE*. Sin embargo, cuando las células se pasaron a través del *ESE* en presencia de progesterona, el porcentaje de espermatozoides capacitados se incrementó  $\approx 2$  veces, mientras que el de los espermatozoides con el ADN fragmentado se redujo aproximadamente a la mitad. Es decir, el *ESE* permite concentrar y seleccionar una población enriquecida en espermatozoides capacitados pero con baja incidencia de fragmentación del ADN.

Para que un espermatozoide pueda llegar al ovocito y fecundarlo, tiene que estar capacitado<sup>7</sup>. Así, solo aquellos que estén capacitados pueden llegar al sitio de fecundación orientándose quimiotácticamente, atravesar el *cumulus*, interactuar con la zona pelúcida, realizar la reacción acrosómica y, finalmente, fusionarse con la membrana del ovocito<sup>7</sup>. Estas observaciones hacen del estado de capacitación un parámetro que permite evaluar el estado fisiológico de una muestra de semen con potencial para fecundar al ovocito. Por otra parte, el daño en el ADN paterno puede conducir al fracaso de la fecundación o del posterior desarrollo<sup>13</sup>. Es decir, la población espermática que selecciona el *ESE* en presencia de progesterona está enriquecida con los mejores espermatozoides para fecundar al ovocito, aquellos que están capacitados y que no tienen dañado el ADN.

### Morfología

El porcentaje de espermatozoides con morfología normal se determinó con el fin de evaluar si el *ESE* en presencia de progesterona permitía mejorar el porcentaje de espermatozoides con morfología normal. Sin embargo, este parámetro se mantuvo con valores similares en las distintas poblaciones espermáticas tanto en muestras normales como teratozoospermicas (Figura 4AB). La ausencia de mejora en la morfología normal con el uso del *ESE* sugiere, por un lado, que la acción del *ESE* se basa esencialmente en aspectos fisiológicos del espermatozoide y no en los morfológicos; y por otra parte, que la valoración de la morfología para la elección del mejor espermatozoide sería un parámetro limitado.

En resumen, el *ESE* no solo selecciona y concentra una población espermática con espermatozoides capacitados, sino que además reduce la proporción de espermatozoides con el ADN fragmentado, aspectos fisiológicos que contribuirían al éxito de la fecundación y posterior desarrollo. Estas bondades fisiológicas no las garantizan los otros métodos de selección espermática que se usan para ICSI y que se basan en la madurez o en la fragmentación del ADN de los espermatozoides. El hecho de poder contar con una población espermática selecta podría mejorar significativamente el tratamiento de la pareja infértil. Actualmente no existen marcadores

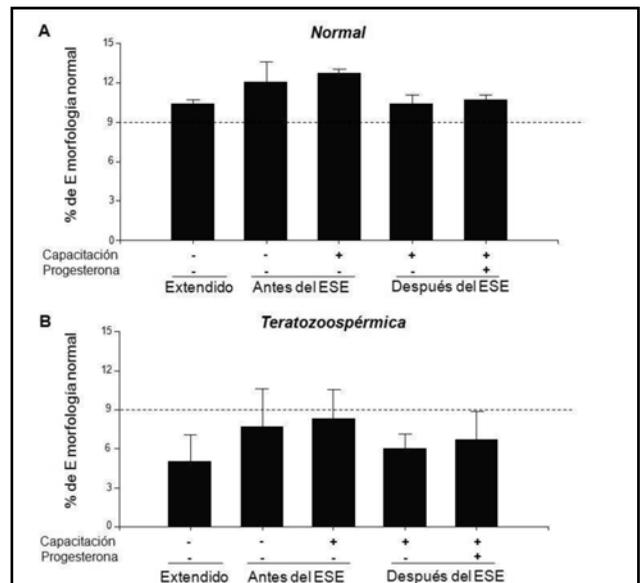
que indiquen en las células vivas cuál es el espermatozoide que está capacitado y que a su vez no tiene dañado su ADN. En el caso de la aplicación del ICSI, la ventaja del *ESE* sería proporcionar una población espermática enriquecida con los espermatozoides más aptos para fecundar al ovocito y así aumentar la posibilidad de que la elección “a ciegas” del espermatozoide coincida con un espermatozoide en las mejores condiciones fisiológicas. El uso de esta población espermática selecta también podría ser beneficioso para una FIV, donde solo los espermatozoides capacitados pueden atravesar las envolturas del ovocito y finalmente fecundarlo. Por lo tanto, la aplicación de esta metodología previa al uso de las técnicas de reproducción asistida podría mejorar el tratamiento de la pareja infértil.

### Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo financiero de FONCYT, CONICET y SECYT-UNC. LCG (Investigadora Independiente CONICET); DRU, MET y HAG (Becarios CONICET); MMM (Becaria FONCYT); LVG (Becaria SECYT-UNC).

### Referencias

1. Kruger TF, Oehninger SC. Male infertility Diagnosis and Treatment. London: Informa. 2007.
2. de Mouzon J, Lancaster P, Gosta Nygren K, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson D. World Collaborative Report on Assisted Reproductive Technology, 2002. Hum Reprod 2009; 9:2310-2320.



**Figura 4.** Porcentaje de espermatozoides (E) con morfología normal según criterio estricto de Kruger, en las distintas poblaciones espermáticas (incluido un extendido de semen fresco) en muestras normales (A) y teratozoospermicas (B).

3. Tesarik J, Mendoza C. Defective function of a nongenomic progesterone receptor as a sole sperm anomaly in infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 58:793-7.
4. Falsetti C, Baldi E, Krausz C, Casano R, Failli P, Forti G. Decreased responsiveness to progesterone of spermatozoa in oligozoospermic patients. *J Androl* 1993; 14:17-22.
5. Oehninger S, Sueldo C, Lanzendorf S, Mahony M, Burkman LJ, Alexander NJ, Hodgen GD. A sequential analysis of the effect of progesterone on specific sperm functions crucial to fertilization in vitro in infertile patients. *Hum Reprod* 1994; 9:1322-7.
6. Giojalas LC, Iribarren P, Molina R, Rovasio RA, Estofán D. Determination of human sperm calcium uptake mediated by progesterone may be useful for evaluating unexplained sterility. *Fertil Steril* 2004; 82:738-40.
7. Eisenbach M. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev Genet* 1999; 25:87-94.
8. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill JD (eds.). *The physiology of reproduction* (2ª edición). New York: Raven Press. 1994:189-858.
9. Aitken RJ, Koopman P, and Lewis SE. Seeds of concern. *Nature* 2004; 432:48-52.
10. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001; 28:82-86.
11. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 2003; 69:211-217.
12. Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J. Natl Cancer Inst* 1997; 89:238-244.
13. Borini A, Tarozzi N, Bizarro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation and embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006; 11:2876-2881.
14. Huszar G, Celik-Ozenci C, Cayli S, Zayaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003; 79:1616-24.
15. Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Current Opinion in Obstet & Gynecol* 2006; 18:260-267.
16. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci C-C, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007; 5:650-663.
17. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Glander HJ, Paasch U. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006; 74:530-537.
18. Rawe V, Álvarez G, Uriondo H, Papier S, Miasnik S, Nodar F. Separación magnética por columnas de anexinas V: "filtrado molecular" para la selección de espermatozoides no apoptóticos. *Reproducción* 2009; 24:104-114.
19. Brewis IA, Moore HD, Fraser LN, Holt WV, Baldi E, Lucon MI, Gadella BM, Ford WCL, Harrison RAP. Molecular mechanisms during sperm capacitation. *Hum Fertil* 2005; 4:253-261.
20. Eisenbach M, Giojalas LC. Sperm guidance in mammals – an unpaved road to the egg. *Nat Rev* 2006; 7:276-285.
21. Gatica LV, Montesinos MM, Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Giojalas LC. A novel method for sperm diagnosis and selection based on chemotactic orientation towards Progesterone. 9th International Congress of Andrology, Barcelona, Spain. *J Androl* 2009a; 30:33.
22. Gatica LV, Montesinos MM, Guidobaldi HA, Teves ME, Unates DR, Molina RI, Giojalas LC. Aplicación de un método basado en la quimiotaxis hacia Progesterona para seleccionar espermatozoides capacitados en muestras normales y subfértiles. XVII Jornadas de la Sociedad de Biología de Córdoba 2009b; Huerta Grande, Córdoba.
23. Jaiswal BS, Eisenbach M. Capacitacion. En: Hardy DM (ed.). *Fertilization*. San Diego: Academic Press. 2002:57-117.
24. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59:1037-1046.
25. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (5ª edición). Geneva: WHO Press. 2010.
26. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Avjer J, Gordon Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger TF, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsohn KM. WHO reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; 16:231-245.
27. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of preparation techniques. *J Androl* 1988; 9:367-376.
28. Zini A, Sigman M. Are Test of DNA Damage Clinically Useful? Pros and Cons. *Journal of Andrology* 2009; 3:219-229.
29. Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Molecular*

Hum Reprod 1996; 8:613-619.

30. McKelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnson SR, Hughes CM, Lewis S, Thompson W. Two potential clinical applications of the alkaline single cell gel electrophoresis assay: i. Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder. ii. Human sperm and male infertility. *Mutat Res* 1997; 375:93-104.

31. Jaiswal BS, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Eisenbach M. Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Lett* 1998; 427:309-313.

32. Larson J. L., Miller D. J. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev* 1999; 4:445-9.

33. Kruger TF, Menkweld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van Der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K. Sperm morphological feature as a prognostic factor in IVF. *Fertil Steril* 1986; 46:1118-1123.

34. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005; 12:3446-3451.