

Influencia de la patología espermática en reproducción asistida

Vanesa Rawe,¹ Cristian Álvarez Sedó,^{1,2} Heydy Uriondo,¹ Héctor Chemes²

¹ Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGYR), Buenos Aires, Argentina.

² Laboratorio de Patología y Fisiología Testicular, Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina.

La siguiente revisión está basada en el capítulo de VY Rawe y HE Chemes. *Morphology does matter: The influence of sperm pathology on ICSI outcome*. Libro de la Reunión de la Federación Internacional de Sociedades de Fertilidad (IFFS), Durban, Sud África, Mayo, 2007.

Reproducción 2009;24:189-198

Está ampliamente establecido que el uso de espermatozoides morfológicamente anormales tiene un impacto en los resultados de técnicas de reproducción asistida (ARTs), incluyendo la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). Desde los años 90' el ICSI se ha convertido en el tratamiento de preferencia para el paciente con diferentes anomalías espermáticas, permite un examen detallado de la motilidad y morfología del espermatozoide que será microinyectado. Dependiendo de la naturaleza de la patología espermática involucrada, los espermatozoides anormales pueden tener una tasa de éxito diferencial en términos de fertilización y desarrollo embrionario.

En los últimos años se ha prestado mucha atención al uso de diferentes herramientas de diagnóstico para caracterizar las patologías espermáticas y establecer un diagnóstico previo a ICSI (Chemes y Rawe, 2003). A pesar de que se han introducido criterios estrictos para la clasificación del espermatozoide y la correlación entre la morfología espermática y el diagnóstico en ARTs ha recibido la aceptación general (Kruger y col, 1986), se conoce poco sobre la estructura interna del espermatozoide (normal o anormal) y su impacto en ICSI. La combinación de microscopía electrónica y estudios de inmunohistoquímica han proporcionado nuevos conocimientos sobre la estructura normal y anormal de espermatozoides y han definido las bases subcelulares de las distintas aberraciones

espermáticas. Dependiendo de las anomalías espermáticas involucradas, los resultados reproductivos cambian drásticamente.

El presente trabajo resumimos e ilustramos cómo algunas patologías espermáticas influyen en los resultados de ICSI y consecuentemente en el pronóstico de fertilidad de hombres severamente afectados.

Espermatozoides sin acrosoma e hipoplasia acrosomal

El acrosoma, una organela derivada del aparato de Golgi de las espermátides, consiste en un saco aplanado con un contenido denso de enzimas hidrolíticas que cubren las dos terceras partes de la región anterior de la cabeza del espermatozoide. La ausencia o el desarrollo incompleto del acrosoma son defectos específicos del espermatozoide que causan infertilidad y que caracterizan dos síndromes bien definidos: espermatozoides sin acrosoma y la hipoplasia acrosomal. Los espermatozoides que carecen de acrosoma muestran una cabeza de forma esférica. La denominación de "globozoospermia" se aplica cuando éstos predominan y constituyen la vasta mayoría de los espermatozoides de una muestra. Los acrosomas pueden estar ausentes o bien presentarse como estructuras perinucleares muy pequeñas (hipoplasias), (Figura 1).

En algunos casos los acrosomas se forman, pero no están adheridos al núcleo debido quizás a que la teca perinuclear está ausente (Álvarez Sedó y col, 2009). La teca perinuclear es una es-

Correspondencia: Vanesa Rawe
E-mail: vrawe@cegyr.com / vanesa.rawe@gmail.com

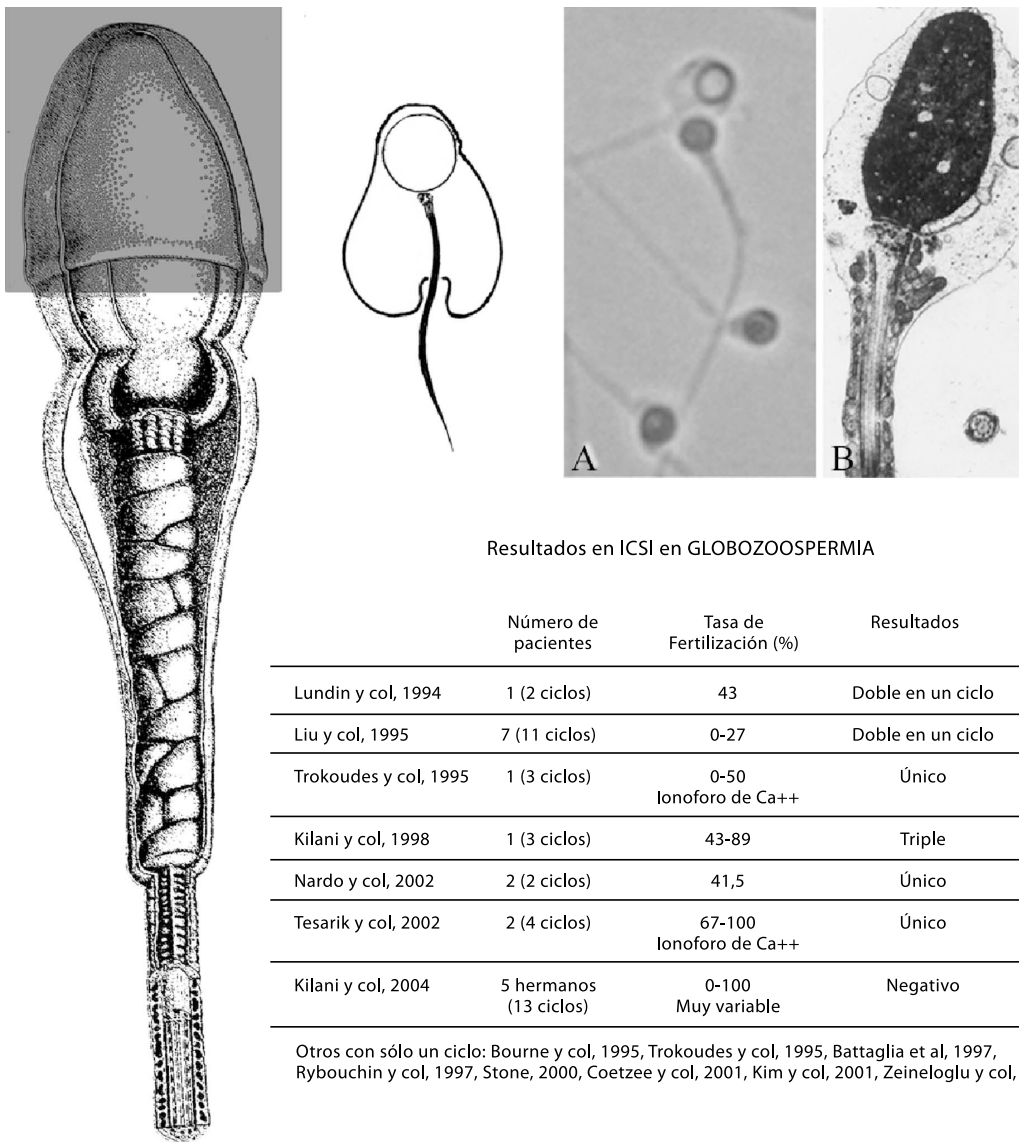
Fe de erratas:

En el número anterior, Nº 3 de la Revista Reproducción, cometimos un error en el listado de los autores del Premio Pedro Ramón Figueroa Casas, Accesit - Básico "Separación magnética por columnas de anexas V: "Filtrado Molecular" para la selección de espermatozoides no apoptóticos". Debera leerse: Autores: Vanesa Rawe, Cristian Alvarez Sedó, Heydy Uriondo, Sergio Papier, Sandra Miasnik, Florencia Nodar.

estructura sub-acrosomal del complejo esqueleto nuclear-perinuclear del espermatozoide que está involucrada en la asociación del acrosoma al núcleo, en el modelado de la forma de la cabeza del espermatozoide y en la activación del oocito luego de la penetración del espermatozoide. Estas anomalías de la teca perinuclear son probablemente las responsables de la forma es-

férica de la cabeza, de la separación del acrosoma y de la activación insuficiente del oocito después de ICSI. Es interesante que la adición de ionóforo de calcio A23187 parezca superar la falta de activación del oocito, siendo ésta una posible terapéutica al momento del ICSI en presencia de espermatozoides sin acrosoma (Tabla de la Figura 1).

Figura 1. Anomalías de la cabeza espermática I. Representación esquemática de las anomalías en la porción cefálica (anomalías del acrosoma) de los espermatozoides humanos (zona sombreada). A: Microscopía de contraste de fase de espermatozoides de un paciente con globozoospermia (cabezas esféricas). B: Microscopía electrónica de transmisión de un espermatozoide anormal con falta de acrosoma. La tabla muestra un compilado de los resultados de ICSI, luego del uso de espermatozoides de pacientes con globozoospermia (Dam y col, 2006).



Resultados en ICSI en GLOBOZOOSPERMIA

	Número de pacientes	Tasa de Fertilización (%)	Resultados
Lundin y col, 1994	1 (2 ciclos)	43	Doble en un ciclo
Liu y col, 1995	7 (11 ciclos)	0-27	Doble en un ciclo
Trokoudes y col, 1995	1 (3 ciclos)	0-50 Ionoforo de Ca ⁺⁺	Único
Kilani y col, 1998	1 (3 ciclos)	43-89	Triple
Nardo y col, 2002	2 (2 ciclos)	41,5	Único
Tesarik y col, 2002	2 (4 ciclos)	67-100 Ionoforo de Ca ⁺⁺	Único
Kilani y col, 2004	5 hermanos (13 ciclos)	0-100 Muy variable	Negativo

Otros con sólo un ciclo: Bourne y col, 1995, Trokoudes y col, 1995, Battaglia et al, 1997, Rybouchin y col, 1997, Stone, 2000, Coetzee y col, 2001, Kim y col, 2001, Zeineloglu y col, 2002

Alteraciones de la cromatina

Durante la espermiogénesis la cromatina espermática sufre un proceso complejo de cambios en su composición proteica y organización macromolecular que resultan en la densa condensación nuclear característica del espermatozoide maduro. Zamboni (1987) describió anomalías en este proceso caracterizadas por la presencia de defectos nucleares lacunares con una estructura hipodensa granular o fibrilar. Estas áreas pueden llegar a ocupar hasta el 30-80 % del volumen nuclear y afectan hasta un 60-80% de la población espermática en pacientes con teratozoospermia severa (Figura 2). Las alteraciones de la maduración y condensación cromatínicas son de origen testicular y se han relacionado con anomalías cromosómicas, organización anormal y rupturas de las cadenas del ADN (Kjessler 1974, Evenson y col 1980, Abramsson 1982, Sakkas y col 1999b), apoptosis espermática y los cambios producidos por la incubación *in vitro* de espermatozoides por períodos prolongados, lo cual debería tenerse en cuenta cuando son usados en reproducción asistida (Baccetti y col 1996; Sakkas y col 1996, 1999a; Blanc-Layrac y col 2000).

El diagnóstico ultraestructural de anomalías de la maduración y condensación nuclear identifica una patología específica de la cromatina en casos de teratozoospermia severa y provee un entendimiento de su etiología que va más allá de la simple descripción morfológica de espermatozoides con cabezas de formas irregulares (aguzadas, amorfas, etc) que aporta muy poco a nuestro entendimiento de la función espermática anormal.

Observaciones longitudinales han revelado que la incidencia de anomalías cromatínicas varía a lo largo de la evolución clínica (en un caso en particular entre 35 y 80%) y es reversible en algunos pacientes. Esto probablemente indica que no hay un componente genético en su patogénesis. En apoyo de este concepto está la observación que afirma que pueden presentarse asociadas a enfermedad inflamatoria intestinal y que pueden ser causadas por factores ambientales o diversas drogas (Zamboni, 1987).

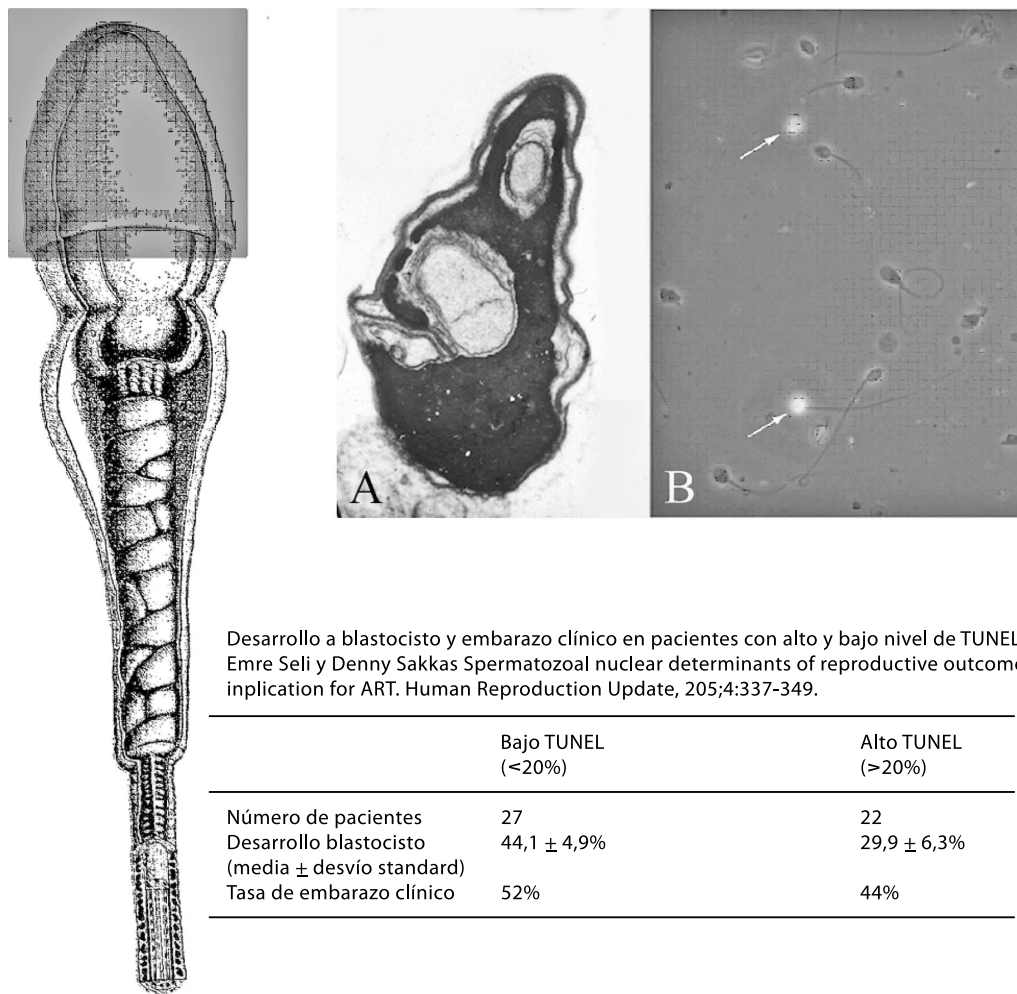
La existencia de estos defectos anticipa un pronóstico de fertilidad reservado. Hemos realizado

estudios ultraestructurales en un grupo numeroso de pacientes teratozoospermicos con valores muy bajos de morfología estricta y defecto cefálico de tipo amorfo. En este grupo hemos encontrado frecuentes alteraciones de la maduración-condensación cromatínica del tipo previamente descrito. Algunos de estos pacientes resultaron infértiles, mientras que otros lograron embarazos seguidos de abortos tempranos (Chemes 2000). Actualmente estamos realizando estudios sobre los resultados del ICSI en pacientes con alteraciones cromatínicas. Cabe mencionar que fallas de fertilización, abortos tempranos y menores índices de nacimientos han sido previamente comunicados en pacientes con alteraciones cromatínicas evaluadas por diversos métodos (Sakkas y col 1996, Evenson y col 1999).

Otra importante alteración en la estructura del núcleo del espermatozoide se relaciona con las rupturas en el ADN espermático (fragmentación del ADN). Esta condición puede darse a partir de diferentes situaciones y una de ellas es la apoptosis. Existen diferentes técnicas para visualizar la fragmentación del ADN espermático y una de las más comúnmente usadas es la llamada TUNEL (del inglés: *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUDP nick-end labelling*, Saleh y col, 2003), (Figura 2). La misma consiste en la fijación y permeabilización de la muestra a evaluar, su incubación con enzima que unirá nucleótidos dUTP marcados (con un fluoróforo como el isotiocianato de fluoresceína o FITC, por ejemplo) y su visualización en microscopio acoplado a luz UV. La citometría de flujo permite el conteo de miles de células y hace a este ensayo más preciso. Los espermatozoides fragmentados mostrarán fluorescencia en sus núcleos (flechas, Figura 2). La literatura establece un valor normal de hasta un 20%. Numerosos estudios muestran elevadas tasas de apoptosis en sémenes con baja movilidad (Barroso y col, 2000, Weng y col, 2002), baja concentración (Oosterhuis y col, 2000) y en pacientes OAT (Shen y col, 2002). Esto tiene significancia clínica pues estas muestras con altas tasas de apoptosis muestran bajas tasa de fertilización (Marchetti y col, 2002), desarrollo a blastocisto (Ver Tabla Figura 2, Seli y Sakkas, 2005) y embarazo (Tomlinson y col, 2001).

Las alteraciones acrosomales tienen un pronóstico dudoso, pero ofrecen esperanzas. No hay publicaciones mostrando resultados de reproducción asistida con el uso de espermatozoides con hipoplasia acrosomal. Este factor podría ser responsable de algunas fallas totales de fertilización en pacientes con teratozoospermia severa o incluso pasar desapercibido ya que se puede asociar a tasas de fertilización sub-óptimas (tasas de fertilización <50%). Las alteraciones cromatínicas son diagnosticadas por microscopía electrónica y corresponden a las "vacuolas" descritas por Bartoov y col (2002), que son responsables de menores tasas de fertilización y mayores abortos tempranos. Su método de selección con microscopía de alta resolución es actualmente motivo de debate. El método de TUNEL examina la integridad del ADN, cuya fragmentación aumentada repercute negativamente sobre los resultados en reproducción asistida. La selección de espermatozoides no apoptóticos a través de las Columnas de anexinas V al momento del ICSI es una técnica experimental que parece tener promisorios resultados. Nuestras investigaciones recientes indican que la microscopía electrónica y el TUNEL examinan diferentes patologías y por ello deben ser indicados simultáneamente cuando el espermograma indica valores muy bajos de morfología estricta (menores del 4%).

Figura 2. Anomalías de la cabeza espermática II. Esta figura incorpora representaciones esquemáticas de anomalías en la porción cefálica de los espermatozoides humanos (zona sombreada) con especial énfasis en defectos de la compactación cromatínica y fragmentación del ADN espermáticos. Los defectos de compactación aparecen como grandes áreas de rarefacción cromatínica al estudio por microscopía electrónica ("vacuolas nucleares", Figura A). La foto de contraste de fase y epifluorescencia documenta espermatozoides afectados/fragmentados (técnica de TUNEL, Figura B, flechas). La tabla muestra los resultados de ICSI con el uso de espermatozoides con normales o elevados niveles de fragmentación del ADN (Bajo TUNEL y Alto TUNEL, respectivamente).



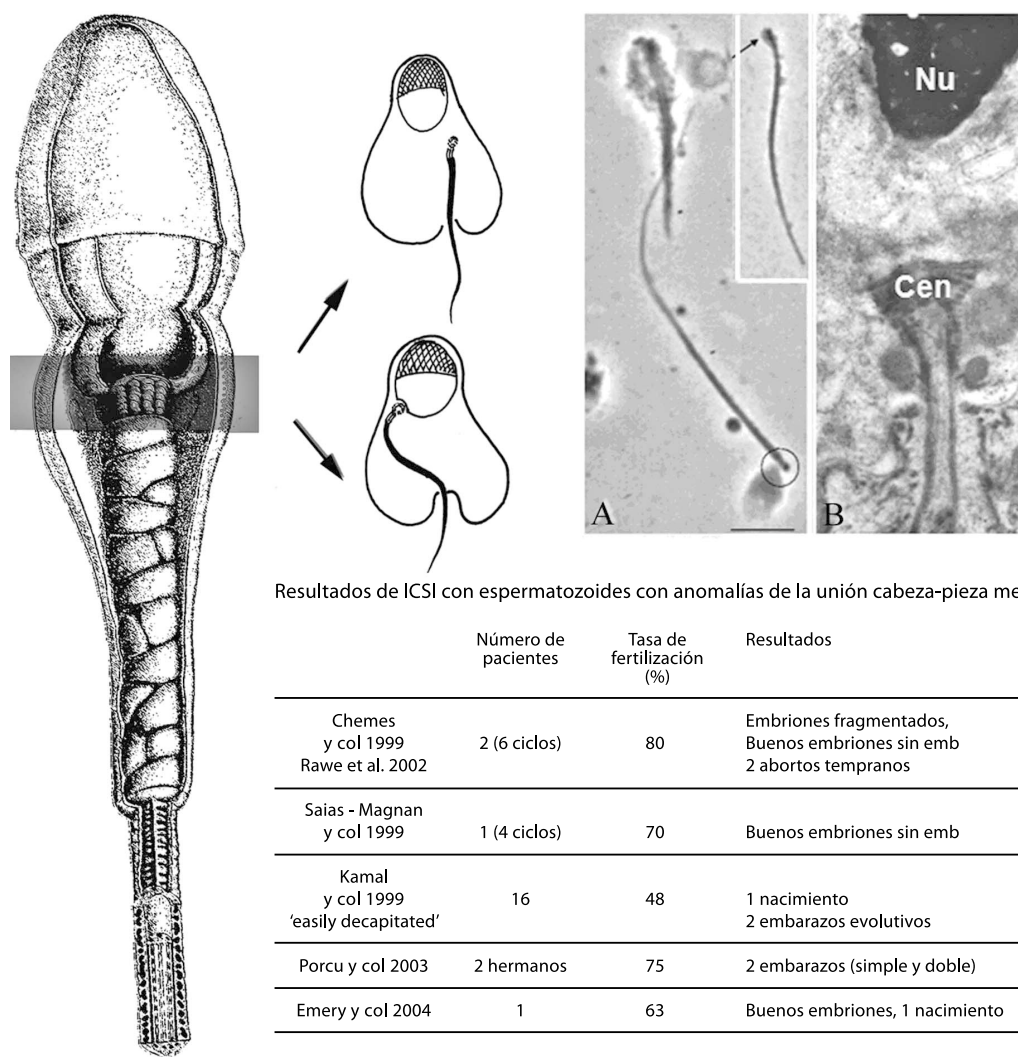
Defectos en la unión cabeza-cuello y espermatozoides acefálicos

De manera similar a lo que ocurre con los pobres resultados en ARTs con las anomalías acrosomales, los defectos en la pieza conectora no tienen un pronóstico alentador luego de ICSI (Figura 3). Las anomalías en la pieza conectora tienen una manifestación fenotípica heterogénea. En algunos pacientes sólo se observan espermatozoides acefálicos en el semen, lo que hace imposible cualquier intento de fertilización (panel superior de la Figura 3). En otros pacientes las formas acefálicas están presentes en menor número y predominan espermatozoides con una alineación cabeza-pieza media anormal (panel inferior de la Figura 3). Chemes y col, (1999) documentaron los resultados de ICSI utilizando espermatozoides con una alineación de cabeza-pieza media defectuosa. Poco después se reportaron dos nuevos intentos fallidos con características similares (Saias Magnan y col, 1999; Rawe y col, 2002). Después de estos primeros fracasos se publicaron tres reportes donde se logró embarazo y parto (Kamal y col, 1999; Porcu y col, 2003; Emery y col, 2004), así como otro éxito con nacimiento

de un niño normal en nuestro medio (comunicación no publicada). En todos estos reportes se ha logrado una tasa de fertilización bastante buena seguida de numerosos embriones arrestados o degenerados. De 6 informes disponibles, 5 nacidos vivos han resultado a partir de 27 ciclos. Se cree que el arresto del clivaje embrionario se origina a partir de un defectuoso centrosoma del espermatozoide para organizar el centro de organización de microtúbulos durante la fertilización. Hemos examinado la función del centrosoma en pacientes con espermatozoides con defectos en la cabeza-cuello microinyectándolos en oocitos bovinos y mostraron una tasa baja de formación del aster espermático, probablemente debido a un centrosoma disfuncional (Rawe y col, 2002). En uno de nuestros pacientes (con 5 intentos fallidos de ICSI) se obtuvieron dos embarazos con aborto temprano cuando se microinyectó el espermatozoide "mejor alineado". En casos con diferentes grados de desalineación en la unión cabeza-pieza media es de particular interés usar un criterio estricto para la selección de espermatozoides durante ICSI.

En resumen, los resultados de ICSI con el uso de espermatozoides con defectos severos en la inserción cabeza-cuello han sido poco alentadores, observándose fallas en el clivaje, en la implantación de embriones aparentemente normales o abortos tempranos (ver Tabla de Figura 3 en la página siguiente).

Figura 3. Anomalías de la unión cabeza-pieza media (cuello). Esta figura incorpora representaciones esquemáticas de anomalías en la porción de la pieza conectora de los espermatozoides humanos (zona sombreada). A: Microscopía de contraste de fase de espermatozoides con defectos de inserción cabeza-cuello en donde se observa un espermatozoide con un ángulo de casi 90° en la zona del cuello (señalado por un círculo). El inserto de arriba a la derecha muestra un espermatozoide acefálico con una pequeña gota citoplásmica al nivel de la pieza media (flecha). B: Microscopía electrónica de transmisión que muestra que el centriolo proximal (Cen) de esta espermátide testicular no se inserta en el polo caudal del núcleo (Nu). Este defecto resulta en una separación de cabeza y flagelo o en una relación anormal entre las mismas. La tabla muestra los resultados de ICSI con el uso de espermatozoides con defectos en la inserción cabeza-cuello.



Defectos en las vainas mitocondriales

Las anomalías en la organización mitocondrial causan astenozoospermia. Esto incluye la ausencia localizada o total de mitocondrias de la pieza media o la agregación local de mitocondrias desorganizadas. Se han observado mitocondrias hinchadas en casos de necrozoospermia y se considera

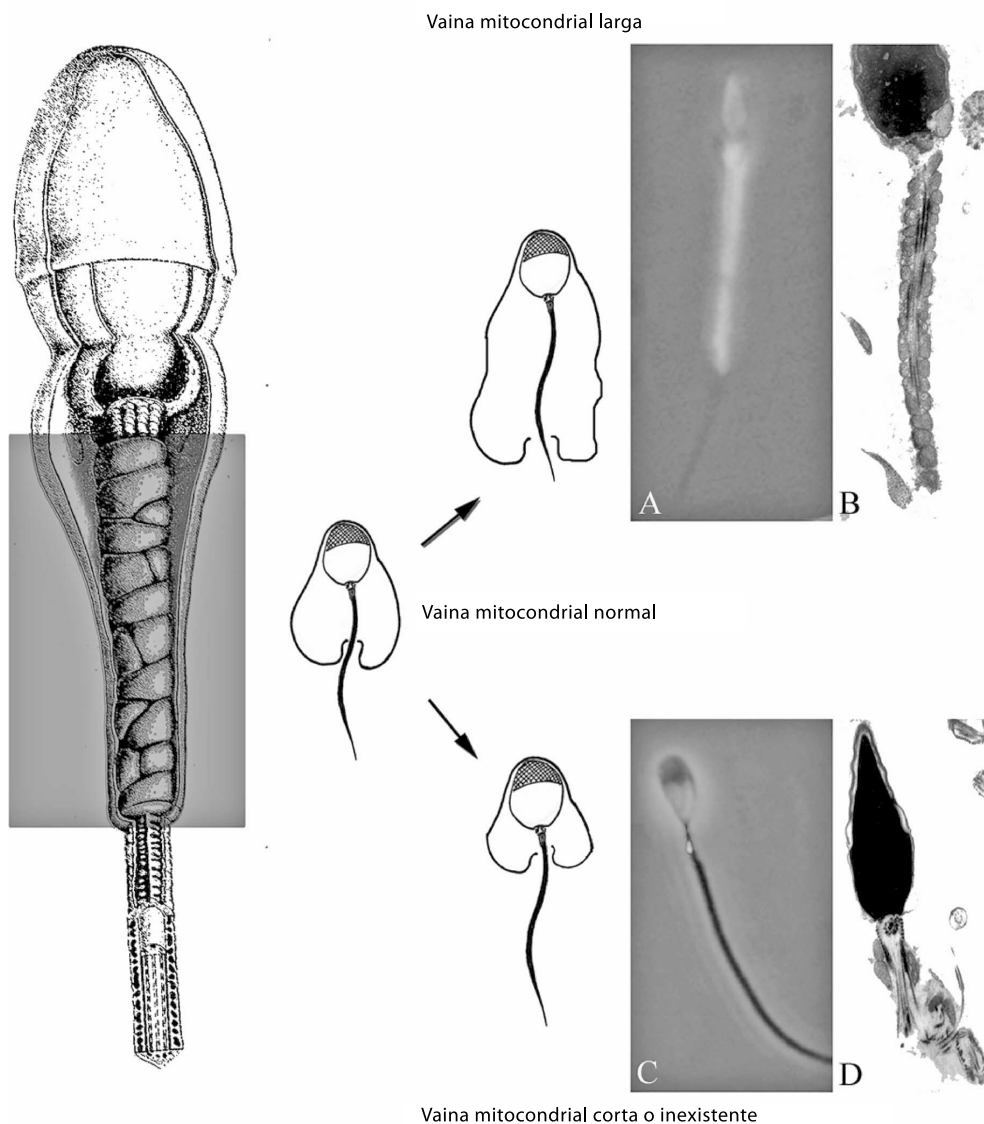
que representan cambios secundarios en la muerte del espermatozoide. La Figura 4 resume las características de los espermatozoides de dos pacientes con astenozoospermia severa (Rawe y col, 2007). Los espermatozoides del paciente 1 tenían una pieza media muy larga (porción superior de la Figura 4). Se realizaron dos ciclos ICSI con una

buena tasa de fertilización y calidad embrionaria, pero no se logró embarazo. El paciente 2 tenía espermatozoides con curvas flagelares agudas a nivel de la pieza media donde el axonema está cubierto directamente por la membrana plasmática. Las

mitocondrias estaban ausentes o bien aparecían en un número muy reducido (porción inferior de la Figura 4). Después del ICSI se transfirieron tres embriones y se ha logrado un embarazo seguido de aborto al final del primer trimestre.

En resumen, los resultados indican que los defectos en la pieza media pueden causar severa astenospermia y menores tasas de fertilización, pero no necesariamente representan un factor pronóstico negativo en reproducción asistida.

Figura 4. Anomalías de la vaina mitocondrial. Esta figura incorpora representaciones esquemáticas de anomalías en la vaina mitocondrial (área sombreada) de espermatozoides humanos: defectos por exceso y distorsión en la vaina mitocondrial (A y B) y defectos por su disminución o ausencia (C y D). A y C representan fotografías de contraste de fase y epifluorescencia con el uso de Mitotraker^{MR} para marcación de la vaina mitocondrial. B y D representan imágenes de microscopía electrónica de transmisión de espermatozoides con larga o corta/ausente vaina mitocondrial respectivamente.



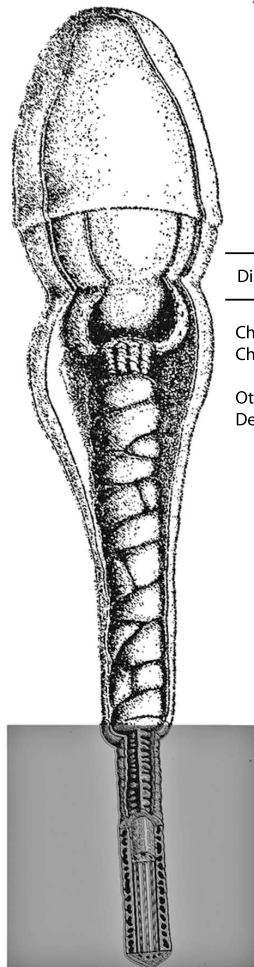
Anomalías flagelares

Nos referiremos a la displasia de la vaina fibrosa (DVF) como un ejemplo de una anomalía flagelar muy severa. Chemes y Rawe (2003) recientemente han revisado numerosos reportes de ICSI en 12 pacientes con DVF (en la tabla dice 8). La fertilización estuvo dentro del rango del 55-70% y se obtuvieron numerosos embarazos y nacidos vivos. La tasa de abortos fue del 20% (3 de 15 embarazos).

Estos alentadores resultados indican que esta subpoblación de pacientes con un factor masculino severo puede esperar buenos resultados con la microinyección de espermatozoides móviles o inmóviles. Por lo tanto, las patologías flagelares que causan inmovilidad de los espermatozoides no comprometen los resultados de ICSI si la viabilidad del espermatozoide no se vio afectada.

La DVF es probablemente una condición genéti-

Figura 5. Anomalías del flagelo espermático. Esta figura incorpora representaciones esquemáticas de anomalías del flagelo espermático (área sombreada) y en especial de los flagelos engrosados propios de la displasia de la vaina fibrosa. A: Microscopía electrónica de transmisión en donde se observa la arquitectura microtubular del axonema normal (flecha). B: Alteraciones flagelares inespecíficas. Compárese con la de los dos flagelos patológicos (doble flecha). C: La vaina fibrosa (VF) forma un anillo regular alrededor del axonema desorganizado. D y E: Displasia de la vaina fibrosa. La hiperplasia y desorganización de las fibras de la vaina (VF) y el engrosamiento de la cola espermática se pueden apreciar en un corte transversal (D) y en la imagen de microscopía electrónica de barrido (E, flagelo corto, grueso e irregular). La tabla muestra los resultados de ICSI con el uso de espermatozoides con DVF.

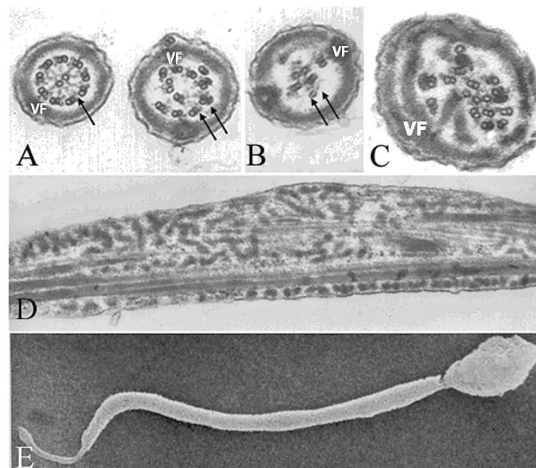


Resultados de ICSI con espermatozoides con displasia de la vaina fibrosa

	Número de pacientes	Tasa de fertilización (%)	Embarazo/Aborto	Nacidos
Displasia de vaina fibrosa	8	78	5/2	10

Chemes y col, Hum Reprod 1998;13:2521-2526
Chemes y Rawe, Hum Reprod Update, 2003

Otros trabajos exitosos con espermatozoides inmóviles (ICSI): Staff y col, 1995, Favero y col, 1999
Deleciones en genes AKAP 3 y 4 presente en 1 de 5 pacientes con displasia de la VF: Bocetti y col, 2005.



ca y, por lo tanto, se ha de tener en cuenta la (posible) transmisión de esta anomalía a la próxima generación. Aunque el número de casos es limitado, no se ha informado en los niños nacidos enfermedades respiratorias (presente en un 20% de los casos de DVF). La incertidumbre sobre su futura fertili-

dad tendrá que esperar algunos años hasta que lleguen a la edad reproductiva. Los futuros padres deben ser conscientes de los riesgos que entraña, pero un consejo genético completo no podrá ser posible hasta que los genes involucrados y el mecanismo de herencia sean identificados.

Hemos resumido información sobre diversas patologías espermáticas y hemos mostrado que, dependiendo de las alteraciones involucradas, el pronóstico de fertilidad cambia significativamente. Aparte del riesgo genético posible, las patologías flagelares son las de mejor pronóstico con ICSI. Las alteraciones cromatínicas, acrosómicas y del cuello espermático tienen un resultado variable con menores porcentajes de éxito, lo que destaca el papel característico que cumplen diversos componentes espermáticos en los procesos de fertilización, desarrollo embrionario temprano e implantación.

Agradecimientos

Un agradecimiento a Constanza Ferrer por su colaboración en la traducción del texto original del inglés al español. En todas las figuras aquí presentadas se realizaron modificaciones a las previamente publicadas por Chemes y Rawe en el Capítulo 6 de *Male Infertility: Diagnosis and Treatment*, editado por Thinus Kruger y Sergio Oehninger, Informa Healthcare (2007). Los dibujos combinan material personal, revisiones casuísticas de la literatura y esquemas basados en *Holstein and Roosen Runge (Atlas of Human Spermatogenesis, Grosse Verlag, Berlín 1981, página 219)*.

Referencias

- Abramsson L, Beckman G, Duchek M, y col. Chromosomal aberrations and male infertility. *J Urol* 1982;128:52-53.
- Alvarez Sedó C, Oko R, Sutovsky P, et al. Biogenesis of the sperm head perinuclear theca during human spermiogenesis. *Fertil Steril* (En prensa).
- Baccetti B, Burrini AG, Collodel G, et al. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996;4:587-596.
- Barroso G, Morshedi M and Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1338-1344.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovski A, Menezes Y, and Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome *Journal of Andrology*, 2002;23:1-8.
- Blanc-Layrac G, Bringuier AF, Guillot R, et al. Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell Mol Biol* 2000;46:187-197.
- Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, et al. Acep-halic Spermatozoa And Abnormal Development Of The Head-Neck Attachment. A Human Syndrome Of Genetic Origin. *Hum Reprod* 1999;14:1811-1818.
- Chemes HE. Phenotypes of Sperm Pathology: Genetic and Acquired forms in the Infertile male. *J Androl* 2000;21:799-808.
- Chemes HE and Rawe VY. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003;9:405-428.
- Dam A, Feenstra I, Westphal J, et al. Globozoospermia revisited. *Hum Reprod* 2006;(Update)1-13.
- Emery BR, Thorp C, Malo J, et al. Pregnancy from intracytoplasmic sperm injection of a sperm head and detached tail. *Fertil Steril* 2004;3:686-688.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm heterogeneity to infertility. *Science* 1980;210:1131-1133.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14:1039-1049.
- Kamal A, Mansour R, Fahmy I, et al. Easily decapitated spermatozoa defect: a possible cause of unexplained infertility. *Hum Reprod* 1999;14:2791-2795.
- Kjessler B. Chromosomal constitution and male reproductive failure. In: *Male Fertility and Sterility*, RE Mancini and L Martini eds. London. Academic Press; 1974.p.231-247.
- Kruger T, Menkveld R, Stander F, y col. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986;46:1118-1123.
- Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P and Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 2002;17:1257-1265.

- Oosterhuis GJE, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J and Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000;74:245-250.
- Porcu G, Mercier G, Boyer P, et al. Pregnancies after ICSI using sperm with abnormal head-tail junction from two brothers: Case report. *Hum Reprod* 2003;18:562-567.
- Rawe VY, Terada Y, Nakamura S, et al. A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage. *Hum Reprod* 2002;17:2344-2349.
- Rawe VY, Hermes R, Nodar, FN, Fiszbajn G, Chemes HE. Results of ICSI in two infertile patients with abnormal organization of sperm mitochondrial sheaths and severe asthenoteratozoospermia. *Fert Steril* 2007;88:649-653.
- Saïas-Magnan J, Metzler-Guillemain C, Mercier G, et al. Failure of pregnancy after intracytoplasmic sperm injection with decapitated spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;14:1989-1992.
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, et al. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003;80:1431-1436.
- Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, et al. Sperm Chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11:837-843.
- Sakkas D, Mariethoz E, St. John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999a;251:350-355.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999b;1:31-37.
- Seli E and Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005;11:337-349.
- Shen H-M, Dai J, Chia S-E, Lim A and Ong C-N. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002;17:1266-1273.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M and Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001;16:2160-2165.
- Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8:984-991.
- Zamboni L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil Steril* 1987;48:711-734.
- Zamboni L. Sperm structure and its relevance to infertility. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:325-344.

San Isidro

Unidad de Fertilidad San Isidro

Director: Dr. Claudio Ruhlmann

Avda. del Libertador 16483 - San Isidro
Tel. (054) 4742-9000 - unifer@fibertel.com.ar

**Próximamente
Apertura, nuevo centro.**

Dirección: Avda. Del Libertador 16958
Tel.: 4743-1991 / 3456 / 3838 / 5225