



Capacitación espermática: una herramienta para las técnicas de reproducción asistida

Sperm capacitation, a tool for assisted reproduction techniques

Elizabeth Cervantes Ibarra,* Leonor A Durán Monterrosas,[‡]
Esperanza Carballo Mondragón,[§] Alberto Kably Ambe^{||}

Resumen

Para lograr una fecundación exitosa por medio de las técnicas de reproducción asistida (TRA), es necesario realizar una capacitación y selección espermática *in vitro* con la finalidad de conseguir una muestra libre de contaminantes y factores decapacitantes, así como obtener la mayor cantidad de espermatozoides viables, móviles y capaces de llegar a fecundar el ovocito. Es indispensable realizar la mejor técnica de preparación espermática dependiendo del tipo de muestra y de la TRA que se llevará a cabo, ya que de esto dependerá en gran medida el éxito del tratamiento. En este artículo se discute el procedimiento de diversas técnicas (técnica de lavado, *swim-up* convencional, gradientes de densidad, microfluidos, MACS y potencial Z), y los casos en los que se recomienda utilizar cada una de ellas.

Palabras clave: Técnicas de reproducción asistida, preparación espermática para reproducción asistida.

Summary

To obtain a successful fertilization through Assisted Reproduction Techniques (ART), it is necessary to implement in vitro sperm capacitation and selection, with the purpose of obtaining a sample free of pollutants and decapacitation factors, as well as, obtaining the greatest amount of viable, mobile and capable spermatozoa to fertilize the oocyte. It is essential to perform the best sperm preparation technique depending on the type of ART, since the success of the treatment will depend largely on these, in this article we will discuss the procedure of various techniques (washing, conventional swim-up, density gradients, microfluid, MACS and Z potential) and the cases in which it is recommended to use each one of them.

Keywords: Assisted reproduction, assisted reproduction techniques.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las técnicas de reproducción asistida (TRA) se definen como el conjunto de técnicas cuyo objetivo es aumentar la probabilidad de lograr un embarazo en parejas que tienen problemas para concebir de manera natural. Entre el 30 y 50% de estas parejas, las causas de infertilidad están asociadas con algún problema del factor masculino, por lo cual es importante que los médicos estudien tanto al hombre,

como a la mujer para poder encontrar la posible causa de infertilidad.^{1,2}

En el caso del factor masculino, la calidad del semen es uno de los factores más importantes para poder conocer el potencial fértil del varón y determinar el curso a seguir, tanto del tratamiento médico que se dará al paciente como de la TRA más adecuada. El principal estudio para su evaluación es el análisis seminal, el cual consiste en evaluar los parámetros macroscópicos (volumen, viscosidad, tiempo de licuefacción, color y pH) y

* Bióloga del Laboratorio del Centro Mexicano de Fertilidad (CEPAM). Hospital Ángeles Lomas.

[‡] Bióloga del Laboratorio del Centro Mexicano de Fertilidad (CEPAM). Coordinadora del Laboratorio de Andrología del Centro Mexicano de Fertilidad (CEPAM). Infertilidad y Reproducción Asistida, Hospital Ángeles Lomas.

[§] Directora de Laboratorio Clínico, Andrología y Embriología del Centro Mexicano de Fertilidad (CEPAM).

^{||} Director del Centro Mexicano de Reproducción Humana. Centro Especializado para la Atención de la Mujer (CEPAM). Profesor Titular

del Curso de Alta Especialidad en Infertilidad y Reproducción Humana (CEPAM), UNAM.

Correspondencia:

Dr. Alberto Kably Ambe
Correo electrónico: drkably@gmail.com

www.medigraphic.com/actamedica

los microscópicos (concentración espermática, movilidad, morfología, viabilidad, aglutinación y presencia de otros tipos celulares) del eyaculado, de acuerdo con los valores de referencia mínimos establecidos por la Organización Mundial de la Salud.^{3,4}

Asimismo, es importante aclarar que la principal función del líquido seminal es bloquear los receptores de membrana y estabilizar el acrosoma en un proceso conocido como "acción decapacitante". Esta decapacitación protege a los espermatozoides durante su periodo de almacenamiento en el epidídimo y durante su paso a través del tracto genital masculino al femenino.

De manera natural, los espermatozoides acaban su maduración y adquieren la capacidad fecundante dentro del tracto genital femenino, con ello se da la llamada capacitación espermática (CE), gracias a la cual se logra la fecundación exitosa, que es definida como la fusión de la membrana interna del acrosoma del espermatozoide con la membrana vitelina del ovocito.^{5,6}

Siguiendo con la evaluación del análisis seminal, recientemente se ha agregado el estudio del índice de fragmentación del ADN (*Figura 1*) al análisis seminal, dado que se ha correlacionado con la teratozoospermia (menos del 4% de espermatozoides con morfología normal), con leuкоzoospermia (más de un millón de leucocitos por mililitro en el eyaculado) y con una cantidad excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) que presentan

un elevado porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado ($\geq 21\%$).^{2,3,7,8}

CAPACITACIÓN Y SELECCIÓN ESPERMÁTICA

De manera *in vivo*, los espermatozoides viajan a través del cérvix, el útero, la unión uterotubal y el oviducto hasta llegar al ampolla, donde aún tienen que atravesar el *cumulus ooforus* y la zona pelúcida para lograr la fecundación. Durante este trayecto, ocurre la capacitación espermática (CE) y, al mismo tiempo, hay una selección de los espermatozoides por parte del tracto genital femenino.^{9,10}

En resumen, se puede definir la CE como una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos por los cuales el espermatozoide termina su maduración y supera barreras fisiológicas dentro del tracto genital femenino, con lo cual se adquiere la capacidad para llevar a cabo los procesos necesarios para fecundar al óvulo, tales como la hiperactivación y la reacción acrosomal.^{6,9,11}

Cuando hablamos de pacientes que requieren someterse a TRA, es necesario que este proceso de capacitación y selección espermática se realice de manera *in vitro*, para imitar los procesos que se dan *in vivo* y de esta manera se obtenga una muestra libre de contaminantes y factores decapacitantes, con un número suficiente de espermatozoides viables, móviles y funcionales para la fecundación. En la actualidad, existen diversas TRA como lo son la

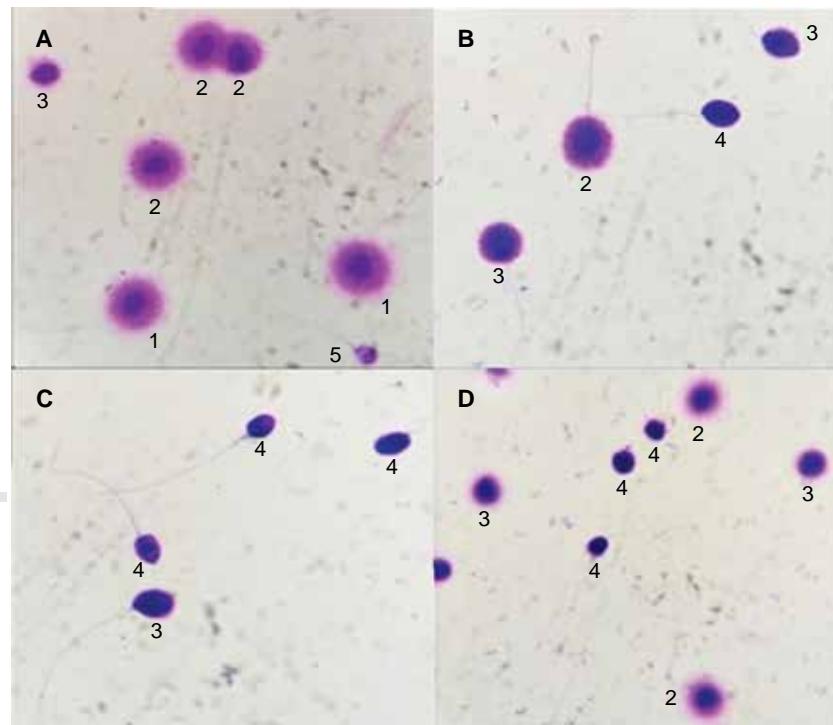


Imagen en color en: www.medgraphic.com/actamedica

Figura 1:

Evaluación de la fragmentación de ADN mediante halos de dispersión de la cromatina espermática. Los espermatozoides sin daños en el ADN se observan con un Halo grande (1) o mediano (2), mientras que los espermatozoides con ADN fragmentado se observarán con un halo pequeño (3), sin halo (4) o degradados (5).

inseminación intrauterina (IUI) y la fecundación *in vitro* (FIV), ya sea de manera convencional o con la técnica de inyección intracitoplasmática (ICSI).^{5,12}

En el caso de la IUI, los espermatozoides capacitados son disparados dentro de la cavidad uterina por medio de un catéter. Esto significa que los espermatozoides aún tendrán que superar algunas barreras fisiológicas del tracto reproductor femenino; sin embargo, cuando hablamos de las técnicas de FIV los espermatozoides, ya no se tienen que superar todas estas barreras.

En el caso de una FIV convencional, los espermatozoides que son depositados en donde se encuentra el ovocito aún tendrán que superar la última barrera: la zona pelúcida. No obstante, cuando se trata de un procedimiento a través de ICSI, sólo un espermatozoide será injectado en el interior del ovocito; a pesar de ello, no se puede saber si este espermatozoide será el más adecuado para fecundar entre toda la población.⁹

Por lo anterior, es indispensable realizar la mejor técnica de capacitación y selección espermática dependiendo del tipo de TRA que se llevará a cabo, ya que de esto dependerá en gran medida el éxito del tratamiento. Las técnicas comúnmente utilizadas son los gradientes de densidad, el *swim-up* convencional y la técnica de lavado, aunque también existen otras nuevas técnicas disponibles, las cuales podrían optimizar la selección de espermatozoides, lo que mejora la capacidad fecundante del gameto. Entre estas técnicas se encuentran: la selección de espermatozoides mediante la técnica de microfluidos, el potencial Z y la separación magnética por columnas de anexina V (MACS).^{1,12,13}

TÉCNICA DE LAVADO

Esta técnica es la más sencilla. Consiste en eliminar el plasma seminal junto con sus factores decapacitantes al realizar un lavado simple de la muestra.⁵ El procedimiento consiste en adicionar a la muestra un medio de cultivo, volumen a volumen y centrifugar; posteriormente, se retira el sobrenadante y se resuspende el botón celular (*Figura 2*) con medio. En el caso de que el lavado se utilice como un paso adicional dentro de otra técnica de capacitación y selección espermática, el procedimiento se quedará hasta este paso; si se pretende utilizar la técnica sola, se recomienda realizar un segundo paso de lavado. El medio que se le adicione al final para resuspender el botón celular dependerá del destino final de la muestra y la concentración a la que se desea trabajar.^{3,5}

La recomendación del manual de la OMS, en su edición del 2010 para un lavado simple, menciona que se debe centrifugar de 300-500 Xg (1,700-2,100 rpm) por cinco a 10 minutos en el primer lavado y en el segundo lavado por tres a cinco minutos.³



Imagen en color en: www.medgraphic.com/actamedica

Figura 2: Técnica de lavado. A la izquierda se observa el modo en que se recolecta una muestra de semen. Pasado el tiempo de licuefacción se procede a realizar la técnica de lavado y se obtiene así el botón celular donde se encontrarán los espermatozoides.

Se sugiere utilizar el lavado cuando la muestra es de buena calidad y se quiera minimizar el daño a los espermatozoides; por lo general, se utilizan muestras de semen que fueron criopreservadas y que se utilizarán en IUI, pues no es necesario que sólo queden los espermatozoides viables, puesto que esta muestra ya capacitada aún tendrá ciertas barreras físicas que atravesar dentro del tracto genital femenino.^{3,14}

SWIM-UP CONVENCIONAL

Esta técnica toma como referencia el proceso *in vivo* en el que los espermatozoides nadan a través del moco cervical, por lo cual se fundamenta en la capacidad que tienen los espermatozoides para moverse a través de diferentes fluidos, donde sólo aquellos espermatozoides con buena movilidad podrán ascender desde el semen al medio de cultivo.^{12,14}

En este procedimiento, el semen licuado requiere de un primer paso de lavado (*Figura 1*), posteriormente se decanta el sobrenadante y el botón celular se resuspende con una o dos gotas de medio; después se añade medio de cultivo y la preparación se deja incubando durante 60 minutos (*Figura 3*). Pasado este tiempo, se recupera la parte superior del sobrenadante en el que se encontraran los espermatozoides capacitados y viables.^{4,12}

El inconveniente de este método es que los espermatozoides inmaduros y el resto de las células como leucocitos, bacterias y células espermáticas inmaduras permanecen en contacto durante todo el proceso con los espermatozoides maduros y pueden producir efectos adversos al aumentar significativamente las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas ROS interfieren con la calidad de los espermatozoides.

des, ya que dañan su membrana plasmática al causar una peroxidación lipídica, lo cual se ve reflejado en una disminución de la movilidad y un aumento de espermatozoides apoptóticos.^{5,12,15,16}

Por las características de este tipo de procesamiento, se recomienda que para la selección de sexo se utilice IUI, de esta manera se parte del supuesto que los espermatozoides con carga genética masculina "Y" son más ligeros que los espermatozoides femeninos "X" y además tienen la capacidad de nadar más rápido. Aquellos espermatozoides serán los que se encuentren en la primera fracción del sobrenadante, y la segunda fracción corresponderá a los espermatozoides femeninos. También puede ser usada en técnicas de FIV cuando el paciente es considerado normozoospérmico y el eyaculado cuenta con un alto número de espermatozoides móviles, ya que esta técnica tiene la gran ventaja de obtener una muestra lo suficientemente limpia, con una disminución en la fragmentación del ADN, sin someter a los espermatozoides al estrés de la centrifugación.^{3,14,15,17,18}

GRADIENTES DE DENSIDAD

La técnica consiste en colocar dos gradientes de diferentes densidades en tubos cónicos de centrifugación. Después de los gradientes, se coloca la muestra de semen (el volumen de muestra debe ser \leq al volumen total de los gradientes) y se procede a centrifugar. Una vez centrifugado, se recupera el botón celular y se coloca en un nuevo tubo preparado previamente con medio de cultivo y se realiza un lavado como se describió anteriormente.^{3,19}

Los gradientes de densidad utilizados actualmente parten de una suspensión coloidal de partículas de sílice



Plasma seminal con crioprotector TYB
Leucocitos y restos celulares
Gradiente de baja densidad Espermatozoides anormales, inmaduros y sin movilidad
Gradiente de alta densidad Espermatozoides viables

Imagen en color en: www.medigraphic.com/actamedica

Figura 4: Capas que se forman en un doble gradiente de densidad.

con silano. Actualmente, esta técnica también es conocida como dobles gradientes de centrifugación (DGC), ya que la mayoría de los kits disponibles comercialmente contienen un gradiente de alta densidad (80-90%) y otro de baja densidad (40-50%).^{3,12,16}

Esta técnica se basa en el fundamento de que todos los componentes del semen tienen diferentes densidades. Los espermatozoides morfológicamente normales y maduros alcanzan el fondo del tubo, debido a que tienen una densidad mayor a 1.10 g/mL (*Figura 4*), mientras que los espermatozoides inmaduros y muertos (densidad de ~1.06 a 1.09 g/mL) junto con el resto de componentes celulares se sitúan en la interfase entre los dos gradientes. También se ha reportado que disminuir la fragmentación del ADN mejora la calidad de los espermatozoides, al eliminar anticuerpos antiespermatozoides y al separar diversos el virus de las células espermáticas cuando se usa junto la técnica de *swim-up*.^{3,12,14,16,20,21}

El manual de la OMS, en su edición del 2010, recomienda centrifugar los gradientes de 300-400 g de 15 a 30 minutos, y el botón celular recuperado resuspenderlo en 5 mL y centrifugar a 200 g de cuatro a 10 minutos.³

Esta técnica puede emplearse en todas las TRA sin importar el tipo de muestra que se maneje, simplemente –dependiendo de los parámetros macroscópicos y microscópicos– se modificarán las condiciones, como el volumen de los gradientes, el tiempo y la velocidad de centrifugación.^{3,14,15,22}



Swim-up

Figura 3: Esquematización de la técnica de *swim-up* convencional. Una vez resuspendido el botón celular después de un primer paso de lavado, se añade medio de cultivo y la preparación se deja incubando durante 60 minutos.

MICROFLUIDOS

La técnica de separación con dispositivos de microfluidos es relativamente nueva. Ésta consiste en separar y capacitar espermatozoides humanos basados en una cámara que proporciona un microambiente de fluidos dinámicos (*Figura 5*), en el que sólo pasaran los espermatozoides viables, ya sea nadando o por difusión, a través de canales diseñados para que sólo los espermatozoides con buena movilidad, fisiología y calidad puedan atravesarlo.^{2,23,24}

En una revisión realizada por Samuel et al. (2018) se clasifican los dispositivos de microfluidos en tres categorías:

1. Dispositivos que sólo aíslan espermatozoides móviles (*Figura 5*).
2. Dispositivos que aíslan todo tipo de espermatozoides sin depender de su movilidad.
3. Dispositivos que aíslan espermatozoides de manera individual para su selección y observación.

Este tipo de capacitación y selección espermática ha demostrado tener un gran éxito en las TRA, ya que distintos autores han reportado que el índice de fragmentación es menor al obtenido con los procedimientos mencionados anteriormente.^{2,9,25-27} Éste suele utilizarse con pacientes cuya morfología espermática es menor al 4% y que presentan un alto grado de fragmentación al intentar de esta forma reducir el fallo de la FIV, ya que los efectos de este trastorno se ven reflejados en alteraciones del desarrollo embrionario, y con ello, se obtiene una menor tasa de embriones que llegan al estadio de blastocisto, tasas de implantación más bajas, aumento en abortos y posibles efectos que pueden afectar la salud del futuro individuo.^{2,7,8,28}

SEPARACIÓN MAGNÉTICA POR COLUMNAS DE ANEXINA V (MACS)

La clasificación magnética de células marcadas por anexina V o MACS (por sus siglas en inglés, *Magnetic Activated Cell Sorting*) es una técnica que se basa en la incubación de espermatozoides con microesferas de hierro biodegradables y magnéticas conjugadas con anexina V.²⁹ Uno de los principales marcadores apoptóticos en las células es la externalización de residuos de fosfatidil serina, ocasionada por una asimetría en la bicapa lipídica. Ya que la anexina V es una proteína altamente afín a la fosfatidil serina, estas microesferas sólo se unirán a los espermatozoides apoptóticos, por lo que quedan así retenidas en la pared magnética de la columna (*Figura 6*) y, de este modo, se obtienen sólo los espermatozoides viables.^{13,29-31}

En la literatura se ha reportado que varones infériles muestran niveles elevados de espermatozoides con marcadores apoptóticos, lo cual también se ha correlacionado con una disminución en el éxito de las TRA, al no utilizar criterios de exclusión de espermatozoides con muerte celular programada, por lo cual se ha sugerido que esta técnica debería de usarse en combinación con otro tipo de CE, como lo son los gradientes de densidad.^{13,31-34}

A pesar de que esta técnica puede llegar a ser de gran ayuda al eliminar aquellos espermatozoides apoptóticos, también se ha reportado que cuenta con una desventaja, ya que puede llegar a afectar la movilidad de los espermatozoides debido a que se necesita un mayor número de centrifugaciones en comparación con las técnicas convencionales. Los pacientes que pueden verse más afectados en estos casos son aquellos hombres con asteno-

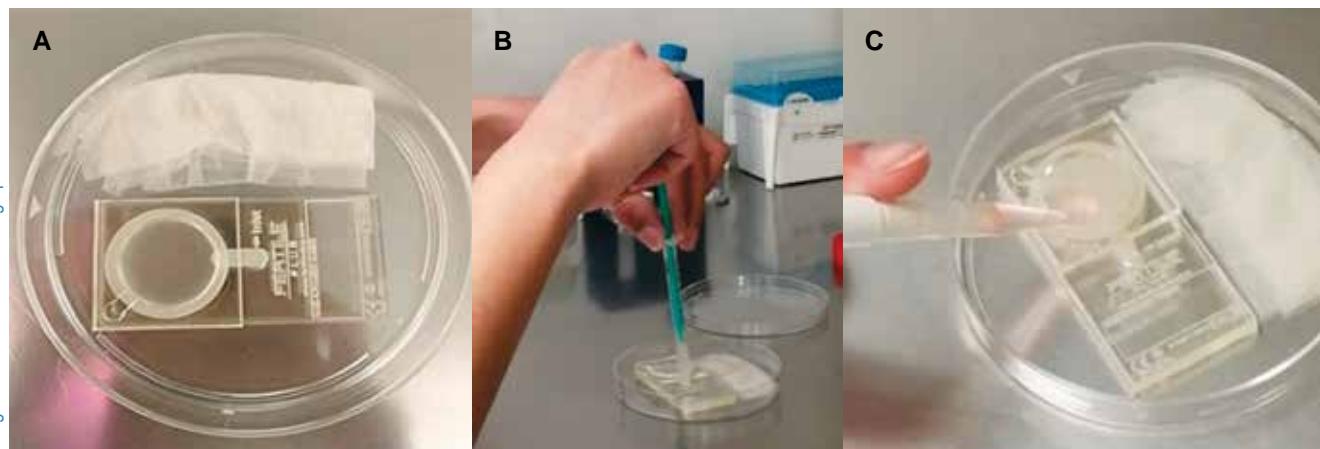


Figura 5: Funcionamiento de un dispositivo de microfluidos. Dispositivo de microfluidos “Fertile Plus” disponible comercialmente. **(A)** la muestra de semen se coloca con ayuda de una jeringa en el orificio inferior. **(B)** mientras que en la parte superior se coloca el medio de cultivo. **(C)** Con este dispositivo sólo se recuperan espermatozoides móviles.

Imagen en color en: www.mediaphic.com/actanmedica**Figura 6:**

Imagen de equipo utilizado para realizar la clasificación magnética de espermatozoides marcados con anexina V (MACS).

zoospermia (movilidad progresiva de los espermatozoides menor al límite de referencia establecido por la OMS [$< 32\%$]) u oligoastenozoospermia (baja concentración espermática [< 15 millones/mL] junto con una movilidad progresiva menor al límite de referencia establecido por la OMS [$< 32\%$]).^{3,30}

Se recomienda utilizar la técnica en los casos en los que se realizará ICSI. El objetivo es seleccionar al espermatozoide más adecuado sin importar la concentración espermática ni la cantidad de espermatozoides móviles.^{9,34}

POTENCIAL Z

Esta técnica se basa en el principio de atracción de cargas eléctricas opuestas, así los espermatozoides cargados negativamente (carga conferida por los glucopéptidos gp20/CD 52 que se adhieren a la membrana espermática durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo) se unirán a las paredes de un tubo cargado positivamente. El nivel de expresión de estas glucoproteínas parece estar correlacionado de manera favorable con el porcentaje de formas normales, así como con el estado de la capacitación del esperma y el estado de fertilidad masculina.^{9,35,36} Su principal objetivo es obtener espermatozoides maduros con una carga negativa que va de -16 mV a -22 mV (a esta carga se le llama potencial Z o potencial electrocinético), ya que se ha reportado que espermatozoides con estos valores interactúan de mejor manera con la membrana del ovocito, mejoran significativamente la calidad de los espermatozoides (movilidad, morfología, hiperactivación, integridad y madurez del ADN y menos espermatozoides apoptóticos) y reducen los niveles de fragmentación del ADN.^{35,37,38}

Esta técnica debe realizarse inmediatamente después del procedimiento de DGC. Consiste en colocar la muestra en un tubo de centrífuga de 15 mL y resuspender con 5 mL de medio de cultivo libre de albúmina de suero humano (HSA); posteriormente, el tubo debe colocarse dentro de un guante de látex y girarlo para cargarlo positivamente y a continuación centrifugar el tubo a 300 g por cinco minutos y decantar el sobrenadante. Finalmente lavar las paredes del tubo con medio suplementado con HSA para neutralizar cargas y recuperar los espermatozoides adheridos a las paredes del tubo.^{9,37}

Se recomienda utilizar este procedimiento principalmente con la técnica de ICSI, ya que tienen la desventaja de recuperar un bajo número de espermatozoides en situaciones de baja concentración; no obstante, ésta puede ser empleada en todo tipo de muestras, incluyendo muestras con oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia o criopreservadas, ya que se ha reportado que este tipo de metodología disminuye significativamente la fragmentación del ADN, lo que recupera espermatozoides de mejor calidad y aumenta las tasas de éxito en los procedimientos de FIV. También puede ser usado como un método de selección de sexo femenino, ya que los espermatozoides portadores de cromosomas XX presentan una carga negativa mayor (~ -20 mV) a comparación de los cromosomas XY (~ -16 mV).^{9,35,36,39}

CONCLUSIÓN

En la actualidad existen diversas técnicas de capacitación y selección espermática, sin embargo, es fundamental comprender en qué consiste cada una de ellas para poder

personalizar cada caso y aplicar la técnica que se adegue mejor a las necesidades de los pacientes.

REFERENCIAS

1. Barroso G, Chaya M, Bolaños R, Rosado Y, García LF, Ibarrola E. Valor pronóstico en las tasas de recuperación para la aplicación de técnicas de preparación seminal y su evaluación en la función espermática. *Ginecol Obstet Mex.* 2005; 73 (5): 221-228.
2. Carballo-Mondragón E, Durán-Monterrosas L, Cervantes-Ibarra E, Kably-Ambe A. Comparación de la técnica de gradientes vs técnica de microfluidos para separación espermática. *Rev Mex Med Reprod.* 2019; 10: 3-8.
3. WHO. *WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen* [Internet]. 5th ed., Cambridge, Cambridge University. 2010: 286 p. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf.
4. Remohí JA, Cobo AC, Prados N, Romero JL, Pellicer A. *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. Laboratorio de reproducción asistida*. 4^a. ed. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2013. pp. 1-458.
5. López García MJ, Urbano Felices A, Cárdenas Povedano M. *Manual de laboratorio para el análisis del semen*. Gutiérrez-Romero J, López-Pelayo I (editores). OmniaScience; 2012: p. 129.
6. Arenas RE, Cambron RA, Ambriz G D, Zúñiga RP, Rodríguez T, Ahiezer. Rosado GA. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *Contacto S.* 2010; 78: 5-11.
7. Bradley CK, McArthur SJ, Gee AJ, Weiss KA, Schmidt U, Toogood L. Intervention improves assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm DNA fragmentation: a retrospective analysis. *Andrology.* 2016; 4 (5): 903-910 [citado el 7 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27231097>.
8. Zheng WW, Song G, Wang QL, Liu SW, Zhu XL, Deng SM et al. Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following *in vitro* fertilization. *Asian J Androl.* 2018; 20 (1): 75-79.
9. Henkel R. Sperm preparation: State-of-the-art: Physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl.* 2012; 14 (2): 260-269.
10. Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec.* 2006; 19 (4): 426-436.
11. Darszon A. Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. *Biotecnología.* 2007; 14 (3): 30-42. Disponible en: http://pt7mdv.ceingebi.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_03.pdf.
12. Sánchez I, Mar C, Castilla JA, Marcos M, Martín I, Galán A et al. Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Documento C. Fase 3. Versión 4. 2009: 23-26.
13. Romaní L, Garrido N, Motato Y, Aparicio B, Remohí J, Meseguer M. 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. *Fertil Steril.* 2014; 102 (6): 1567-1576.
14. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007; 65: 515-525.
15. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1: 108.
16. Beydola T, Sharma RK, Agarwal A. Sperm preparation and selection techniques. In: Rizk B, Aziz N, Agarwal A, editors. *Male infertility practice*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2013: pp. 244-251.
17. Neri VP, Gaona AR, Serviere ZC. Inseminación intrauterina con selección de sexo: una técnica modificada de capacitación espermática sencilla, económica y efectiva. *Rev Mex Med Repro.* 2011; 4 (2): 77-81.
18. Volpes A, Sammartano F, Rizzari S, Gullo S, Marino A, Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during *in vitro* fertilization procedures. *J Assist Reprod Genet.* 2016; 33 (6): 765-770. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-016-0696-2>.
19. Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abu-Elmagd M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014; 12: 121.
20. Oshio S, Kaneko S, Iizuka R, Mohri H. Effects of gradient centrifugation on human sperm. *Arch Androl.* 1987; 19 (1): 85-93 [citado el 7 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3426342>.
21. Kuji N, Yoshii T, Hamatani T, Hanabusa H, Yoshimura Y, Kato S. Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing. *Fertil Steril.* 2008; 90 (5): 1983-1987. [citado el 22 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18166180>.
22. Carballo ME, Campos CJ, Ortiz-Reyes H, Kably AA. Comparación de tres métodos de capacitación espermática para ICSI en pacientes con morfología anormal. *Rev Mex Med Reprod.* 2011; 4 (2): 68-71.
23. Samuel R, Feng H, Jafek A, Despain D, Jenkins T, Gale B. Microfluidics-based sperm sorting and analysis for treatment of male infertility. *Transl Androl Urol.* 2018; 7 (Suppl 3): S336-S347.
24. Smith GD, Takayama S. Gamete and embryo isolation and culture with microfluidics. *Theriogenology.* 2007; 68 (Suppl. 1): S190-195.
25. Shirota K, Yotsutomo F, Itoh H, Obama H, Hidaka N, Nakajima K et al. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertil Steril.* 2016; 105 (2): 315-321.
26. Suh RS, Phadke N, Ohl DA, Takayama S, Smith GD. Rethinking gamete/embryo isolation and culture with microfluidics. *Hum Reprod Update.* 2003; 9 (5): 451-461.
27. Schuster TG, Cho B, Keller LM, Takayama S, Smith GD. Isolation of motile spermatozoa from semen samples using microfluidics. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7 (1): 75-81 [citado el 7 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12930579>.
28. Sedó CA, Bilinski M, Lorenzi D, Uriondo H, Noblia F, Longobucco V et al. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA Assist Reprod.* 2017; 21 (4): 343-350.
29. Troya J, Zorrilla I. Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. *JBRA Assist Reprod.* 2015; 19 (2): 66-69.
30. Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Said TM, Agarwal A, Abu-Hmeidan F et al. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril.* 2009; 92 (2): 572-5577. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1705>.
31. Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander H, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl.* 2008; 29 (2): 134-142.
32. Sheikhi A, Jalali M, Gholamian M, Jafarzadeh A, Jannati S, Mousavifar N. Elimination of apoptotic spermatozoa by magnetic-activated cell sorting improves the fertilization rate of couples treated with ICSI procedure. *Andrology.* 2013; 1 (6): 845-849.
33. Merino-Ruiz M, Morales-Martínez FA, Navar-Vizcarra E, Valdés-Martínez OH, Sordia-Hernández LH, Saldívar-Rodríguez D et al. The elimination of apoptotic sperm in IVF procedures and its effect on pregnancy rate. *JBRA Assist Reprod.* 2019; 23 (2): 112-116.
34. Ziarati N, Tavalaei M, Bahadorani M, Nasr-Esfahani MH. Clinical outcomes of magnetic activated sperm sorting in infertile men

- candidate for ICSI. *Hum Fertil (Camb)*. 2018; 22 (2): 118-125. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14647273.2018.1424354>.
35. Duarte C, Núñez V, Wong Y, Vivar C, Benites E, Rodriguez U et al. Impact of the Z potential technique on reducing the sperm DNA fragmentation index, fertilization rate and embryo development. *JBRA Assist Reprod.* 2017; 21 (4): 351-355.
 36. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Shayesteh M, Tavalaei M. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. *Andrologia*. 2010; 42 (1): 13-19.
 37. Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, Patton WC. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertil Steril*. 2006; 85 (2): 481-486.
 38. Zarei-Kheirabadi M, Shayegan Nia E, Tavalaei M, Deemeh MR, Arabi M, Forouzanfar M et al. Evaluation of ubiquitin and annexin V in sperm population selected based on density gradient centrifugation and zeta potential (DGC-Zeta). *J Assist Reprod Genet*. 2012; 29 (4): 365-371 [citado el 17 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22183502>.
 39. Ishijima SA, Okuno M, Mohri H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *Int J Androl*. 1991; 14 (5): 340-347.
 40. Cerezo PG, Castilla AJ, Rodríguez HH. *Manual para el análisis básico de semen: una guía práctica*. México D.F.: Editorial Pardo. 2014.
 41. Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod*. 1998; 59 (1): 1-6.
 42. Li SH, Hwu YM, Lu CH, Lin MH, Yeh LY, Lee RK. Serine protease inhibitor SERPINE2 reversibly modulates murine sperm capacitation. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (15): pii: E1520.
 43. Matsuura K, Uozumi T, Furuichi T, Sugimoto I, Kodama M, Funahashi H. A microfluidic device to reduce treatment time of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2013; 99 (2): 400-407 [citado el 7 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23122951>.