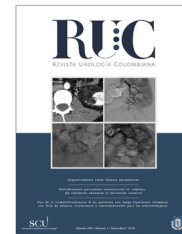




SCU
Sociedad Colombiana de Urología®

REVISTA
UROLOGÍA
Colombiana

www.elsevier.es/uroco



ORIGINAL

Selección espermática *in vitro*: espermatozoides con mejores características funcionales



Paula Cristina Lalinde Acevedo y Walter Darío Cardona Maya*

Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia

Recibido el 4 de marzo de 2016; aceptado el 20 de abril de 2016
Disponible en Internet el 26 de mayo de 2016

PALABRAS CLAVE

Infertilidad;
Selección
espermática;
Parámetros
espermáticos
funcionales;
Estrés oxidativo;
Fluorescencia;
Citometría de flujo

Resumen

Introducción: La infertilidad masculina representa al menos la mitad de los casos de parejas infértiles. Para su diagnóstico generalmente no se tienen en cuenta los parámetros funcionales de los espermatozoides, ni alteraciones fisiológicas como el estrés oxidativo.

Objetivo: Comparar los parámetros seminales convencionales y funcionales de hombres con fertilidad comprobada respecto a los de hombres con fertilidad desconocida, además de cuantificar el efecto de la selección espermática sobre diferentes marcadores de estrés oxidativo en los espermatozoides.

Materiales y métodos: Se evaluaron los parámetros seminales convencionales (volumen, concentración, movilidad, viabilidad y morfología espermática) y funcionales (potencial de membrana mitocondrial, integridad de la membrana plasmática, lipoperoxidación de membranas, producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno intracelulares e integridad de la cromatina espermática) en semen y espermatozoides sin seleccionar y seleccionados, así como en hombres con fertilidad probada y en hombres con fertilidad desconocida.

Resultados: Los espermatozoides seleccionados y los de hombres fértiles tuvieron menores índices de fragmentación de la cromatina espermática. Los hombres fértiles tuvieron mayor porcentaje de espermatozoides que producían especies reactivas del oxígeno. Los espermatozoides de hombres fértiles tuvieron menor porcentaje de lipoperoxidación. Adicionalmente, el procesamiento para seleccionar los espermatozoides no afectó la integridad de la cromatina espermática, a pesar de observarse un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno.

Conclusión: Los parámetros funcionales, y no solo los convencionales de los espermatozoides seleccionados y los de hombres fértiles, son superiores a los de las muestras sin seleccionar y a los de hombres con fertilidad no probada.

© 2016 Sociedad Colombiana de Urología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: wdario.cardona@udea.edu.co (W.D. Cardona Maya).

KEYWORDS

Infertility;
Sperm selection;
Functional sperm
parameters;
Oxidative stress;
Fluorescence;
Flow cytometry

In vitro* sperm selection: Sperm cells with improved functional characteristics*Abstract**

Introduction: Male infertility is responsible for at least half of the cases of infertile couples, but its diagnosis does not always include functional sperm parameters or the evaluation of physiological alterations, such as oxidative stress.

Objective: To compare conventional and functional sperm parameters of fertile men and men with unknown fertility status. In addition, to quantify the effect of the sperm selection process on different oxidative stress markers in sperm cells.

Materials and methods: Conventional (volume, concentration, motility, viability, and sperm morphology), and functional (mitochondrial membrane potential, integrity of sperm chromatin, production of intracellular reactive oxygen and nitrogen species, plasma membrane integrity, and lipid peroxidation of cell membranes) sperm and semen parameters were evaluated in men with proven fertility and men with unknown fertility, as well as in non-selected and selected sperm.

Results: The selected sperm and those from fertile men showed lower rates of sperm chromatin fragmentation and a higher percentage of sperm producing reactive oxygen and nitrogen species. The spermatozoa of fertile men had a lower percentage of lipid peroxidation. Additionally, the selection procedures did not affect sperm chromatin integrity, despite the increase in production of reactive oxygen species.

Conclusion: The functional, and not only the conventional sperm parameters from fertile men and of selected sperm, are superior compared to unselected semen samples, and those from men with unknown fertility.

© 2016 Sociedad Colombiana de Urología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La infertilidad es una condición que afecta aproximadamente a un 15% de las parejas en edad reproductiva del mundo^{1,2} y todavía en sociedades como la nuestra es considerada un problema atribuido a la mujer, aun cuando el hombre es responsable del 50% de los casos^{1,3}.

El diagnóstico de la infertilidad masculina se basa principalmente en la evaluación de los parámetros seminales convencionales, los cuales involucran el análisis macroscópico y microscópico del eyaculado⁴. Sin embargo, usualmente no se tiene en cuenta la evaluación de las propiedades funcionales del espermatozoide, ni de las anomalías fisiológicas como el estrés oxidativo, las cuales contribuyen al origen de la infertilidad masculina^{5,6}.

El estrés oxidativo en las células espermáticas es un conjunto de eventos desencadenados por un desbalance entre la producción, exógena y endógena, de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) y la disponibilidad de moléculas y enzimas antioxidantes en el semen y en el espermatozoide^{7,8}. Las ERO, formadas principalmente durante el metabolismo aerobio en la mitocondria, son moléculas y radicales libres derivados del oxígeno muy inestables químicamente, con la capacidad de generar otras especies igualmente reactivas como las ERN⁹.

Un exceso de ERO/ERN que sobrepase la capacidad antioxidante seminal y celular tiene consecuencias deletéreas sobre los espermatozoides, y causa fragmentación del ADN espermático y peroxidación de los lípidos en las membranas, lo que afecta la movilidad y la habilidad de fusión con el oocito^{1,8,10}, sin embargo, en una cantidad moderada desencadenan procesos fundamentales para el espermatozoide

como la hiperactivación, la capacitación espermática y la reacción acrosomal^{7,11}.

Por otro lado, cuando los espermatozoides son depositados en la vagina, en su ascenso por el útero hacia el oocito sufren varios procesos de selección de los más aptos para la fecundación, bien sea por el pH ácido de la vagina, el ataque de las células del sistema inmune de la mujer o al pasar por el cuello uterino y el moco cervical^{12,13}.

En los procesos de fertilización asistida se utilizan técnicas para seleccionar artificialmente los espermatozoides, como el *swim-up* y los gradientes de diferente densidad¹⁴, metodologías que, debido a la utilización de procesos de centrifugación, pueden causar estrés oxidativo en las células espermáticas¹³.

El objetivo de este trabajo fue comparar los parámetros seminales convencionales y funcionales de hombres con fertilidad comprobada respecto a hombres con fertilidad desconocida, además de cuantificar el efecto de la selección espermática sobre diferentes marcadores de estrés oxidativo en las células espermáticas.

Materiales y métodos**Obtención y procesamiento de las muestras seminales**

Se analizaron los eyaculados de 36 hombres voluntarios aparentemente sanos: 26 (32 ± 7,2 años) que consultaron al Grupo Reproducción de la Universidad de Antioquia por curiosidad en conocer su calidad seminal o por requerimiento médico (grupo de estudio [GE]) y 10 individuos

fértiles ($31,1 \pm 3,1$ años) que tenían al menos un hijo menor de un año o su pareja en estado de embarazo (grupo fértil [GF]). Las muestras seminales se recolectaron por masturbación en recipientes estériles después de un periodo de abstinencia sexual recomendado de 2 a 5 días.

Análisis seminal convencional

Después de completado el proceso de licuefacción de las muestras de semen (30-60 min, a 37°C), se realizó el análisis seminal convencional (volumen, pH, apariencia, viscosidad del semen, concentración, concentración total, movilidad, viabilidad y morfología espermática) de acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS)^{4,15,16}. La concentración de espermatozoides se determinó usando una cámara de Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel)¹⁷ y la morfología de los espermatozoides se analizó siguiendo los criterios estrictos de Tygerberg¹⁸. No se incluyeron en los análisis muestras de semen con leucocitospermia ($>1 \times 10^6$ leucocitos/mL).

Análisis de parámetros funcionales

Los análisis de citometría de flujo se llevaron a cabo en el citómetro de flujo Epics XL (Becton Dickinson, CA, EUA), con una longitud de onda de excitación de 488 nm suministrada por un láser de argón. Las mediciones de dispersión frontal (*forward scatter*) y de dispersión lateral (*side scatter*) se utilizaron para seleccionar la población de espermatozoides y para excluir los detritos y agregados que producen efectos indeseados en la fluorescencia general. Un total de 10.000 eventos fueron obtenidos por prueba y todos los datos fueron analizados posteriormente usando el programa FlowJo 7.6.2 (FlowJo LLC, OR, EUA).

Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

El $\Delta\Psi_m$ se evaluó usando la tinción con yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC6³, Molecular Probes Inc., Países Bajos), un colorante lipófilo, catiónico y selectivo para las mitocondrias de células vivas, el cual indica el estado del potencial de la membrana mitocondrial. El yoduro de propidio (IP, Molecular Probes Inc., Países Bajos) se utilizó como contratinción con el fin de discriminar los espermatozoides necróticos/muertos¹⁹. Brevemente, 2×10^6 de espermatozoides se incubaron en 300 μL de buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4, Gibco®, NY, EUA) con DiOC6 (concentración final de 10 nM) y con IP (concentración final de 12 μM) protegidos de la luz (30 min, a 25°C). A continuación, los espermatozoides en PBS se lavaron (centrifugación a 180 g, 5 min), se descartó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en PBS para la evaluación mediante citometría de flujo. Los datos fueron analizados como el porcentaje de espermatozoides vivos con alto y bajo $\Delta\Psi_m$ (emiten alta y baja fluorescencia en verde, respectivamente) y de espermatozoides necróticos/muertos (emiten fluorescencia roja).

Producción intracelular de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

Los niveles intracelulares de ERO y de ERN fueron evaluados utilizando 2',7'-di-acetato de dicloro-di-hidrofluoresceína (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, concentración

final de 1 μM). Al ingresar el DCFH-DA en la célula espermática, sufre la escisión de los grupos acetato por las esterasas intracelulares; el DCFH resultante, no fluorescente, es oxidado por las ERO y ERN (específicamente por H_2O_2 , HO-, ROO- y ONOO-) hasta 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) el cual fluoresce en verde al ser excitado por el láser azul usado en el citómetro de flujo¹⁹. La suspensión de células se incubó protegida de la luz (30 min, a 25°C) con DCFH-DA (concentración final de 1 μM) y con IP (concentración final de 12 μM) para excluir los espermatozoides necróticos/muertos, se lavó 3 veces con PBS (180 g, 5 min) y el botón se resuspendió en PBS antes de analizarlo en el citómetro de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de espermatozoides negativos para IP y positivos para DCF que exhiben fluorescencia en verde: espermatozoides vivos que producen ERO y ERN.

Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

Se utilizó el estuche comercial Live/Dead® Sperm (Molecular Probes Inc., Países Bajos) para evaluar la integridad de la membrana plasmática, el cual permite discriminar 3 poblaciones de espermatozoides. Brevemente, 2×10^6 de espermatozoides se incubaron protegidos de la luz (30 min, a 25°C) en 300 μL de PBS con Sybr-14 (concentración final de 1 μM) y con IP (concentración final de 12 μM) para excluir los espermatozoides necróticos/muertos, se lavaron con PBS (180 g, 5 min) y se resuspendieron en PBS antes del análisis por citometría de flujo. Los datos se expresan como el porcentaje de espermatozoides viables (con la membrana plasmática intacta: positivos para Sybr-14 que emiten fluorescencia verde, pero negativos para IP), espermatozoides necróticos/muertos (positivos para IP con fluorescencia roja, pero negativos para Sybr 14) o espermatozoides moribundos (dobles positivos).

Peroxidación de las membranas lipídicas

La degradación oxidativa de los lípidos de membrana se evaluó usando el colorante BODIPY (581/591) C₁₁ (Molecular Probes Inc., Países Bajos) de acuerdo con el método propuesto por Aitken et al.²⁰. BODIPY (581/591) C₁₁, una vez incorporado a las membranas espermáticas, emite fluorescencia naranja que cambia a verde cuando es peroxidado por las ERO. Dos millones de espermatozoides en 300 μL de PBS se incubaron protegidos de la luz (30 min a 25°C) con BODIPY (581/591) C₁₁ (concentración final 6,6 M), se lavaron en PBS (180 g, 5 min) y se resuspendieron en PBS antes del análisis por citometría de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de espermatozoides que exhiben la respuesta de fluorescencia verde.

Integridad de la cromatina

La evaluación de la estructura de la cromatina espermática (SCSA®) se utilizó para determinar el índice de fragmentación del ADN espermático (IFA), según lo descrito previamente por Evenson et al.²¹ y adaptado en nuestro laboratorio^{19,22-24}. Brevemente, 400 μL de una solución de detergente ácido (HCl, NaCl, Triton X-100, agua, pH: 1,2) se añadieron a 5×10^6 de espermatozoides suspendidos en 200 μL de buffer TNE (Tris-HCl, NaCl y EDTA, pH: 7,4). Después de 30 s, los espermatozoides se tiñeron con 600 μL de naranja de acridina (6 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

EUA) y se analizaron inmediatamente en el citómetro de flujo. El IFA se calculó con la intensidad media de fluorescencia (IMF) roja en proporción a la fluorescencia total (IMF roja + IMF verde), multiplicada por 100.

Selección espermática

A 9 de las 26 muestras de los voluntarios se les realizó selección espermática y se compararon los parámetros funcionales de los espermatozoides antes de ser seleccionados (no seleccionados [NS]) y después de ser seleccionados (S).

Para la selección de los espermatozoides móviles progresivos se utilizó un gradiente de densidad discontinua (PureSperm 40/80, Nidacon, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, se adicionaron a un tubo cónico, sin mezclarse, 400 μ L del gradiente de mayor densidad, 400 μ L del gradiente de menor densidad y entre 800 y 1.000 μ L de la muestra total de semen. Posteriormente, se centrifugó a 300 g por 20 min, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el botón en 1 mL de PBS. Inmediatamente, de la suspensión de espermatozoides seleccionados se tomaron el número de alícuotas necesarias para cuantificar los parámetros funcionales espermáticos. Adicionalmente se evaluó la viabilidad y la movilidad de los espermatozoides recuperados.

Análisis estadístico

La distribución de los datos se evaluó con la prueba de normalidad de los residuos. Las comparaciones se realizaron usando la prueba de t de Student cuando los grupos de datos seguían una distribución normal y la prueba de Mann-Whitney y la prueba de los rangos Wilcoxon para comparar las variables que no presentaron distribución gaussiana. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) y un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los datos que siguieron una distribución normal se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) y los que no, como mediana y rango.

Resultados

Los parámetros convencionales del GE comparados con el de los hombres fértiles GF se compilaron en la [tabla 1](#). Aunque ambos grupos tuvieron parámetros convencionales muy

similares, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal es mayor en el GF ($p = 0,0008$), mientras que el porcentaje de espermatozoides viables es mayor en GE ($p = 0,0007$).

La lipoperoxidación espermática fue significativamente menor en el GF respecto a GE ($p = 0,0047$), de manera similar en este grupo se observa una tendencia a la disminución en el $\Delta\Psi_m$ alto, en el porcentaje de células viables y en el IFA ([fig. 1](#)).

Por otro lado, en los espermatozoides seleccionados se evidenció un aumento significativo del número de espermatozoides con $\Delta\Psi_m$ alto ($p < 0,0001$), del número de espermatozoides viables ($p = 0,0313$) y del porcentaje de espermatozoides positivos para DCF, respecto a los espermatozoides no seleccionados ($p = 0,0052$). Adicionalmente, en 3 de los marcadores de estrés oxidativo se evaluó el porcentaje de células necróticas (potencial de membrana mitocondrial, integridad de la membrana plasmática y producción de ERO/ERN): en todas resultó una cantidad inferior de células necróticas en los espermatozoides seleccionados ([fig. 2](#)).

Discusión

En este trabajo, los parámetros convencionales y funcionales de un grupo de hombres sanos con fertilidad desconocida se compararon con los de un grupo de hombres con fertilidad probada, y se obtuvieron como resultado valores similares para los parámetros seminales convencionales. Sin embargo, conforme a lo que han demostrado estudios previos^{25,26}, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal fue significativamente mayor en el GF, aun cuando todos los valores estaban por encima de los límites inferiores de referencia propuestos por la OMS en 2010^{4,15}.

Los valores de referencia para los parámetros seminales convencionales han permitido caracterizar la calidad seminal de hombres fértiles y, con cada edición del manual para análisis seminal humano de la OMS se intenta disminuir las diferencias intra- e interlaboratorios¹⁶. Aunque la morfología, la movilidad y la viabilidad espermática se han considerado los principales parámetros espermáticos involucrados en la fecundación natural exitosa del oocito²⁶⁻²⁸, la determinación final de cuáles parámetros espermáticos son los más importantes a la hora de que los espermatozoides fecunden al oocito continúa siendo motivo de estudio. Diferentes investigaciones han asociado el exceso de ERO con la baja calidad seminal²⁸⁻³⁰ o con infertilidad idiopática,

Tabla 1 Distribución de los parámetros seminales convencionales

Parámetro convencional	Grupo de estudio (GE) n = 26	Grupo fértil (GF) n = 10	P
Volumen (mL)	3,1 \pm 1,5	3,2 \pm 0,9	0,93
Concentración ($\times 10^6$ espermatozoides/mL)	108,4 \pm 66,1	90,1 \pm 58,2	0,44
Concentración total ($\times 10^6$ espermatozoides/eyaculado)	324 \pm 231	267 \pm 125,4	0,98
Viabilidad (%)	79,2 \pm 10,4	65,3 \pm 6,9	0,0007
Movilidad progresiva (%)	56,7 \pm 13,0	57,3 \pm 6,1	0,88
Morfología normal (%)	6,4 \pm 3,0	10,2 \pm 4,3	0,0088

Los valores se representan como media \pm DE.

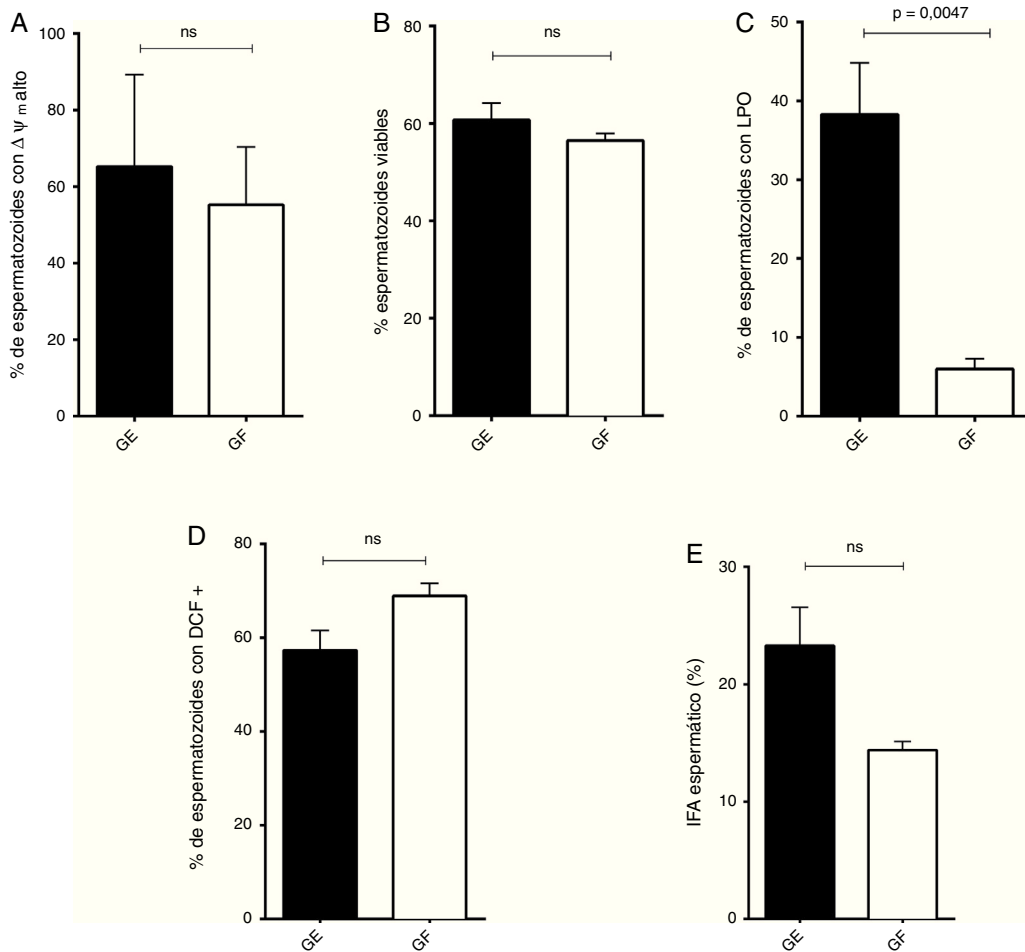


Figura 1 Distribución de los parámetros funcionales de GE y GF.

A) Espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) alto (mediana y rango). B) Integridad de membrana plasmática (media y SEM). C) Espermatozoides con lipoperoxidación de las membranas (LPO, media y SEM). D) Espermatozoides positivos para DCF (media y SEM). E) Índice de fragmentación de la cromatina (IFA, media y SEM).

la cual no es explicada por alteraciones en los parámetros seminales convencionales¹⁹.

Es interesante que el GF presentó un mayor porcentaje de células espermáticas vivas que producían ERO/ERN, aunque la lipoperoxidación de las membranas, un parámetro relacionado con la producción de ERO, fue significativamente menor en el GF; resultados similares fueron observados en los espermatozoides seleccionados.

El papel de las ERO/ERN en los procesos fisiológicos del espermatozoide es debatido, puesto que es opacado por el efecto negativo que ejercen al desencadenar eventos de estrés oxidativo. Los espermatozoides de los hombres del GF y los espermatozoides seleccionados son un referente de las células espermáticas idóneas para fecundar un oocito y se espera que tengan condiciones fisiológicas superiores. Esto indica que las ERO/ERN detectadas hacen parte del metabolismo y la señalización celular de los espermatozoides de mejor calidad, a su vez, da cuenta del papel fundamental de la regulación celular ejercida por las moléculas antioxidantes en el plasma seminal y por las enzimas antioxidantes intracelulares para prevenir el daño estructural de origen oxidativo en el espermatozoide.

Debido al efecto directo de la fragmentación del ADN en el desarrollo anómalo del embrión^{22,23}, el daño en la integridad de la cromatina espermática como consecuencia del daño oxidativo causado por las ERO y las ERN se ha estudiado ampliamente^{13,23,31,32}, con el fin de establecer algún parámetro predictivo de fertilidad en los hombres. Aunque no fueron significativamente diferentes, el IFA del GF fue menor, lo que señala que en el GE están incluidos hombres que probablemente tendrán alteraciones reproductivas cuando deseen concebir un hijo.

Trabajos realizados por Zini et al.^{33,34} demostraron que la preparación espermática usando gradientes de diferente densidad incrementa el porcentaje de daño en el ADN y esto lo atribuyeron a la mayor producción de ERO debido a los procesos de centrifugación y al uso de los gradientes de diferente densidad. Sin embargo, en el presente estudio la calidad espermática evaluada con diferentes marcadores de estrés oxidativo fue superior en los espermatozoides seleccionados, incluyendo la integridad de la cromatina espermática, a pesar de presentar un aumento de las ERO/ERN.

Finalmente, la selección espermática es un paso fundamental en el camino de los espermatozoides hacia el

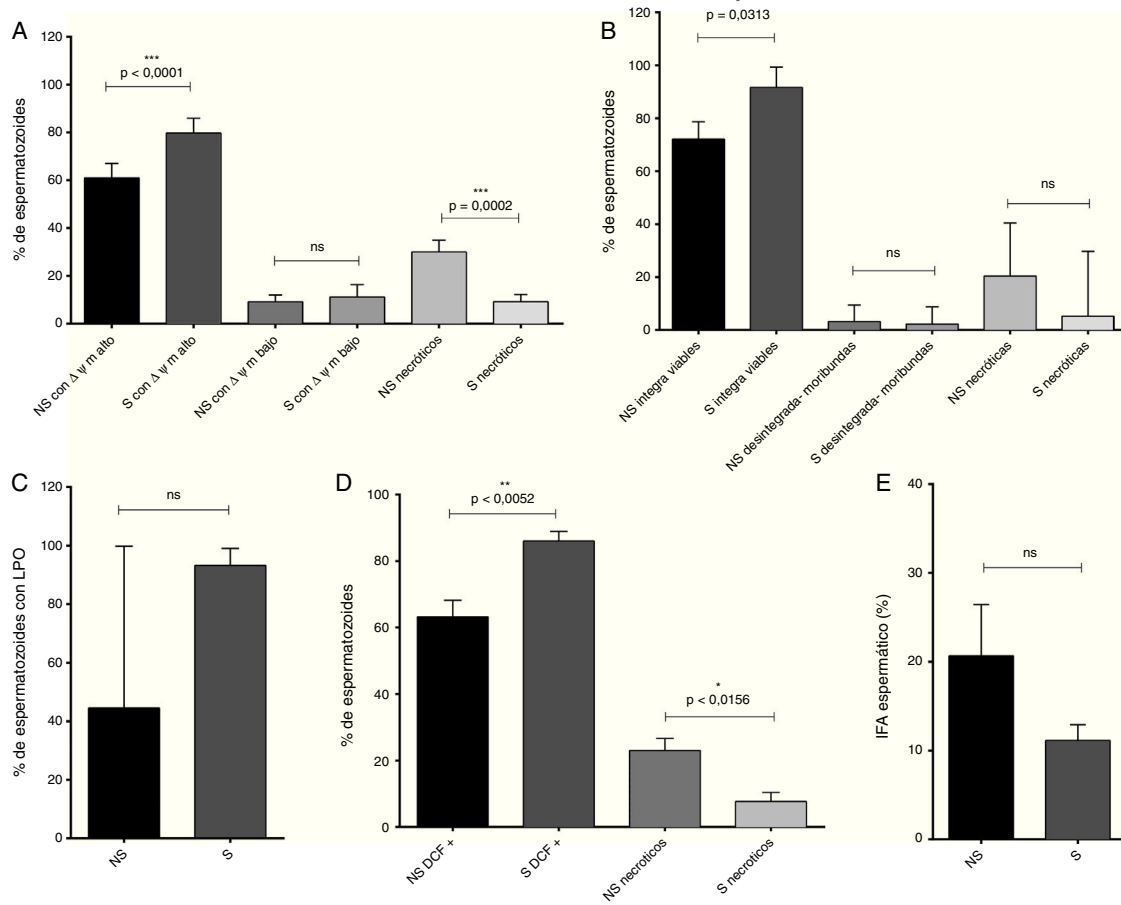


Figura 2 Marcadores de estrés oxidativo evaluados en los espermatozoides no seleccionados (NS) y postseleccionados (S). A) Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) alto y bajo (media y SEM). B) Integridad de la membrana plasmática-viabilidad (mediana y rango). C) Lipoperoxidación de las membranas celulares (LPO, mediana y rango). D) Porcentaje de espermatozoides positivos para DCF (media y SEM). E) Índice de fragmentación de la cromatina (IFA, media y SEM).

oocito en el tracto reproductivo femenino. En los laboratorios de reproducción asistida generalmente se realiza una selección espermática artificial con el fin de obtener los «mejores» espermatozoides con el menor daño en el ADN, además de para eliminar detritos y células que incrementen las especies reactivas del oxígeno exógenas y que afecten el balance oxidante-antioxidante, como lo son los espermatozoides inmaduros y los leucocitos^{13,35}. No obstante, es contradictorio el hecho de que aislar a los espermatozoides del semen, su principal fuente de protección antioxidante, los hace más vulnerables al ataque oxidativo de las ERO y ERN³⁰, cuando se ha demostrado que no separar a los espermatozoides del plasma seminal en los primeros 30 min después de recolectado el semen disminuye la capacidad de fertilización *in vitro*^{36,37}.

Conclusión

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se concluye que se encuentran mejores características, no solo convencionales sino también funcionales, en los espermatozoides seleccionados y en las muestras seminales de hombres fértiles. La información generada en este trabajo contribuye a las investigaciones previas desarrolladas con el fin de determinar si la evaluación de los parámetros espermáticos funcionales

puede ser una herramienta para definir los espermatozoides de mejor calidad, así como para buscar tratamientos efectivos más específicos para las alteraciones en la fisiología espermática que afectan la fertilidad masculina.

Responsabilidades éticas

Protección a personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

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

Derecho a la privacidad y al consentimiento informado. Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiación

El presente estudio fue financiado por la Estrategia de Sostenibilidad, Grupo Reproducción, de la Universidad de Antioquia. PCLA es joven investigadora de Colciencias.

Conflicto de intereses

Los autores manifestamos no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

- Cruz DF, Lume C, Silva JV, Nunes A, Castro I, Silva R, et al. Oxidative stress markers: Can they be used to evaluate human sperm quality? *Turk J Urol*. 2015 Dec;41(4):198–207.
- Winters BR, Walsh TJ. The epidemiology of male infertility. *Urol Clin North Am*. 2014;41(1):195–204.
- Du Plessis SS, Kashou A, Vaamonde D, Agarwal A. Is there a link between exercise and male factor infertility? *Open Reprod Sci J*. 2011;3:105–13.
- World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Ginebra, Suiza: WHO; 2010.
- Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin Biochem*. 2011;44(4):319–24.
- Mahfouz RZ, du Plessis SS, Aziz N, Sharma R, Sabanegh E, Agarwal A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertil Steril*. 2010;93(3):814–21.
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iulii GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*. 2014;16(1):31–8.
- Mayorga Torres JM, Peña B, Cadavid AP, Maya C, Walter D. La importancia clínica del ADN espermático en el análisis seminal cotidiano. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2015;80(3):265–8.
- Bartosz G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol*. 2009;77(8):1303–15.
- Aitken RJ. Human spermatozoa: Revelations on the road to conception. *F1000 Prime reports*. 2013;5:39.
- De Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm capacitation as an oxidative event. En: Ashok Agarwal R, John Aitken, Juan G, Alvarez, editores. *Studies on men's health and fertility. Oxidative stress in applied basic research and clinical practice*. Nueva York: Humana Press; 2012. p. 57–94.
- Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*. 2006;12(1):23–37.
- Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat MS, Shafiee H, Anchan RM, et al. Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Adv Healthc Mater*. 2014;3(10):1671–9.
- Beydola T, Sharma RK, Agarwal A. Sperm preparation and selection techniques. En: Rizk B, Aziz N, Agarwal A, Sabanegh E, editores. *Medical and surgical management of male infertility*. Nueva Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2014. p. 244–51.
- Cardona-Maya W. Límite inferior de referencia-nuevos valores de referencia en el análisis seminal. *Medicina & Laboratorio*. 2014;20(1-2):93–4.
- Cardona-Maya W. Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud-2010. *Actas Urol Esp*. 2010;34(7):577–8.
- Cardona Maya WD, Berdugo Gutiérrez JA, De los Rios J, Cadavid AP. Functional evaluation of sperm in Colombian fertile men. *Arch Esp Urol*. 2007;60(7):827–31.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986;46(6):1118–23.
- Mayorga-Torres BJM, Cardona-Maya WD, Cadavid AP, Camargo M. Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. *Actas Urol Esp*. 2013;37(4):221–7.
- Aitken RJ, Wingate JK, de Iulii GN, McLaughlin EA. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(4):203–11.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002;23(1):25–43.
- Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Role of male factor in early recurrent embryo loss: Do antioxidants have any effect? *Fertil Steril*. 2009;92(2):565–71.
- Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2010;94(4):1465–72.
- Rodriguez E, Gil-Villa AM, Aguirre-Acevedo DC, Cardona-Maya W, Cadavid AP. Evaluación de parámetros seminales no convencionales en individuos cuyas parejas presentan muerte embrionaria temprana recurrente: en busca de un valor de referencia. *Biomédica*. 2011;31(1):100–7.
- Munuce M, Cardona-Maya W, Berta C. ¿Existe asociación entre la morfología normal del espermatozoide y su cinética de desplazamiento? *Actas Urol Esp*. 2006;30(6):591–7.
- Agarwal A, Tvrdá E, Sharma R. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:45.
- Saacke RG. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*. 2008;70(3):473–8.
- El-Taieb MA, Herwig R, Nada EA, Greilberger J, Marberger M. Oxidative stress and epididymal sperm transport, motility and morphological defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;144 Suppl 1:S199–203.
- Koppers AJ, de Iulii GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(8):3199–207.
- Aitken RJ, Gibb Z, Mitchell LA, Lambourne SR, Connaughton HS, de Iulii GN. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol Reprod*. 2012;87(5):110.
- Mayorga-Torres BJ, Camargo M, Agarwal A, du Plessis SS, Cadavid AP, Cardona Maya WD. Influence of ejaculation frequency on seminal parameters. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:47.
- Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol Biol*. 2013;927:147–64.
- Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology*. 2000;56(6):1081–4.
- Zini A, Nam RK, Mak V, Phang D, Jarvi K. Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing. *Fertil Steril*. 2000;74(4):824–7.
- Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abuzenadah AM, Abu-Elmagd M. Sperm quality after density gradient centrifugation with 3

- commercially available media: A controlled trial. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:121.
36. Kanwar K, Yanagimachi R, Lopata A. Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 1979;31(3):321-7.
37. Björndahl L, Mortimer D, Barratt CL, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U, et al. Sperm preparation. A practical guide to basic laboratory andrology. Nueva York, EUA: Cambridge University Press; 2010. p. 167-88.