



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

HOSPITAL ÁNGELES LOMAS

**“Resultados de fertilización,
segmentación y embarazo entre
la técnica de PICSI vs ICSI”**

TESIS DE POSGRADO

Para obtener el Diploma como
Especialista en Ginecología y Obstetricia

Presenta:

Dr. Sergio Caldera Rodarte

Asesor:

Dr. Alberto Kably Ambe



Huixquilucan, estado de México, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

División de Estudios de Posgrado

Hospital Ángeles Lomas

**“Resultados de fertilización, segmentación y embarazo entre la técnica de
PICSI vs ICSI”**

En el Centro Especializado Para la atención de la Mujer, Hospital Ángeles Lomas

T E S I S D E P O S G R A D O

Para obtener el Título en la especialidad de:

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

P R E S E N T A

DR. SERGIO CALDERA RODARTE

Asesor: Dr. Alberto Kably Ambe

Jefe de la Unidad de Reproducción Asistida

Del Centro Especializado para la Atención de la Mujer

Hospital Ángeles Lomas

Huixquilucan, Edo. De México. 2008

DEDICATORIA

A Dios: Como amigo inseparable me ha dado la oportunidad de ver realizadas mis metas.

A Papá y Mamá: Que con el ejemplo, amor y apoyo logramos juntos este momento.

A Mi Hermana: Por compartir momentos inolvidables.

A Mi Esposa: Por el amor, paciencia y comprensión, que me otorga incondicionalmente.

A Gerardo y Sergio Por ser el motor de cada día.

AGRADECIMIENTOS.

Doy las gracias a mi Maestro y Amigo José Cuauhtémoc Cano Enríquez por dar inicio a este camino interminable sobre la Ginecología y Obstetricia.

A mis Maestros en especial al Dr. Samuel Karchmer por el todo el apoyo recibido.

A una gran lista de amigos Médicos que sin duda alguna han sido el ejemplo a seguir en estos momentos.

Contenido

Introducción.....	1
Marco Teórico.....	12
Objetivo.....	23
Material y Métodos.....	23
Resultados.....	25
Comentario.....	26
Conclusión.....	27
Bibliografía.....	30

Introducción.

En años recientes, el significado en castellano de la palabra “*infertilidad*”, ha venido a unificarse con el concepto anglosajón. Anteriormente, el término “*esterilidad*” se empleaba para definir la incapacidad de una pareja para lograr la concepción e “*infertilidad*” se reservaba para la incapacidad de llevar a término un embarazo.

Actualmente, el concepto de infertilidad se refiere simplemente a la “ineficacia reproductiva”, independientemente de su etiología y abarcando incluso, el periodo neonatal temprano. Aunque este concepto ha venido a unificar términos y a simplificar las ideas, parece claro que en el fondo, el idioma español es mucho más vasto y explícito que el idioma inglés y, aunque la terminología anteriormente utilizada parecía rebuscada, nos permitía significar la idea clara y precisa del concepto que se pretendía expresar.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad se define como: “la imposibilidad de que una pareja consiga un embarazo en un año, con relaciones sexuales regulares y sin protección”.³

Sabemos que la capacidad reproductiva de la especie humana es bastante limitada, se tiene la evidencia de que se pierde, por lo menos, una de cada cuatro gestaciones, aunque se señala que esto es cierto únicamente para las pérdidas

gestacionales con evidencia clínica, ya que si se consideran las pérdidas subclínicas, esta cifra se eleva cuando menos, al 50%.

Para el correcto estudio de la infertilidad, tienen que tomarse en cuenta diversas circunstancias. En primer lugar, es imperativo el estudio integral de ambos miembros de la pareja, ya que la estadística muestra que la frecuencia de alteraciones en el varón y la mujer es prácticamente al 50 %, además, en un 30 % de las ocasiones, es posible identificar problemas de fertilidad en ambos miembros de la pareja.

La historia del estudio y tratamiento de la infertilidad es ya longeva y, sin embargo, es a partir del desarrollo de las técnicas de reproducción asistida, cuando el avance en el conocimiento de la fisiología de la reproducción humana, ha tenido un desarrollo considerable. Hace no mucho tiempo, la mayoría de los estudios y tratamientos de la infertilidad, se llevan a cabo en la mujer y el varón era excluido o tardíamente estudiado, tanto por ignorancia médica, como por la existencia de tabúes de "masculinidad", en la actualidad y por fortuna, la mayoría de los protocolos de estudio de infertilidad, suelen comenzar por el varón.

Para considerar que un protocolo de estudio es completo, debe incluir la totalidad de las causas o factores conocidos. Sin embargo, aun habiendo estudiado todos los factores, existe por lo menos un 5% de casos en los cuales no es posible determinar la causa de infertilidad.

Como nemotécnica, vale la pena recordar los factores involucrados en la fertilidad, desde el más “externo”, al más “interno”. Por razón natural, el factor más externo a la mujer, lo constituye su pareja (factor masculino), le seguirían el coital, vaginal, cervical, uterino, tubo-peritoneal, endocrino-ovárico y otros factores, como el inmunológico y el infeccioso.

Estadísticamente, es bien conocido que el índice de fecundabilidad (la posibilidad de una pareja, de quedar embarazada en un mes), es del 20 al 25%. Si realizamos un análisis progresivo, a los 3 meses, las posibilidades se incrementan al 60-65%, a los 9 meses llegan al 75% y al año 80-90%.

La frecuencia de la infertilidad mundialmente reportada, es del 10 al 15%, por lo tanto, una pareja que tiene una adecuada exposición al embarazo durante un año y no ha logrado la concepción, deja de manifiesto su incapacidad reproductiva y es por ello, candidata para ingresar a los diversos protocolos de estudio de la infertilidad.

Algunas veces, la falta de información sobre la fisiología del coito, desalienta la posibilidad de embarazo. Cabe recordar que, durante la etapa de excitación en el ciclo de respuesta sexual femenina, los ligamentos cardinales y en menor medida, los ligamentos útero-sacros, elevan el útero en relación a la vagina para desplazar al cérvix hacia arriba y exponer el fondo de saco vaginal posterior, con el fin de proporcionar una mayor longitud a la vagina. Una vez que se produce la eyaculación, el contenido seminal se deposita en el fondo vaginal y entre 20 y 30

minutos después, sufre un proceso de coagulación. Mientras esto ocurre, los ligamentos cardinales y útero-sacros se relajan, permitiendo al cérvix “sumergirse” en el depósito seminal. Aproximadamente 30 minutos después de la coagulación del semen, éste comienza un proceso de licuefacción y es entonces, cuando se produce la mayor cantidad de paso de los espermatozoides a través del cérvix, en dirección a la cavidad uterina.

El desconocimiento de este proceso fisiológico, ocasiona que con alguna frecuencia, las mujeres se incorporen posteriormente a la conclusión del coito, impidiendo que se lleven a cabo estos procesos de coagulación-licuefacción, lo que conlleva a una considerable pérdida de semen, y por ende, a una disminución en las posibilidades para la concepción.

El factor vaginal también es muy importante, son varias las patologías que se pueden encontrar en ese lugar anatómico. En orden de frecuencia, las diversas infecciones que suelen presentarse en este órgano, pueden reprimir el coito, fundamentalmente por inflamación de la mucosa, lo que ocasiona dispareunia y por lo tanto, un rechazo consciente o inconsciente al coito.

Las infecciones causadas por *Chlamydia tracomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma*, que suelen ser asintomáticas y pasar fácilmente inadvertidas son causa común de este fenómeno. Es ampliamente conocido el efecto deletéreo que tienen estos microorganismos hacia el embarazo en sí, por su acción nociva sobre los espermatozoides, óvulos y embriones. Debido a ello, una parte fundamental en

el estudio del factor vaginal, lo será de manera obligada, la toma de cultivos que incluya estos gérmenes.

De igual manera defectos müllerianos suelen estar presentes, aunque con mucha menor frecuencia, como la vagina tabicada que, en ocasiones, puede desembocar en un fondo de saco ciego y no necesariamente en el cérvix.

Se presentan con mucha frecuencia casos de vaginismo, que tienen una etiología multifactorial y que suelen iniciarse después del nacimiento. No existe mucha información útil en la literatura al respecto, pero son pacientes que, a veces, pueden mejorar con terapia psicológica y de pareja.

Es bien conocido el hecho de que los espermatozoides reciben una capacitación por parte del moco cervical, que además, les facilita el ingreso a la cavidad uterina durante la etapa fértil y se convierte en una barrera casi impermeable, durante la gestación. Igualmente es ampliamente sabido que las criptas cervicales, actúan como depósitos de espermatozoides, a partir de las cuales, puede continuar el paso de los mismos en dirección a las salpinges, aún días después de transcurrido el coito.

Hace algunos años, se incluían de manera rutinaria, las pruebas poscoitales, dentro del estudio del factor cervical. La más representativa de ellas, es la prueba de Sims Huhner. Estas pruebas tienen como finalidad, tratar de evaluar desde un punto de vista funcional, la interacción de los espermatozoides con el cérvix.

El problema en la interpretación de estas pruebas, radica en su alta inconsistencia. En ocasiones, con pruebas cuyos resultados eran muy favorables, el embarazo no se conseguía y, por el contrario, en casos donde la prueba reportaba una inmovilidad espermática absoluta, el embarazo podía ocurrir en un tiempo más o menos breve.

El factor uterino ha sido invocado como causal de infertilidad entre el 5 al 10% de los casos. La presencia de pólipos o miomas intracavitarios y algunas de las malformaciones müllerianas, han demostrado ser causa tanto de infertilidad, como de pérdida de la gestación, por ello, el estudio de la cavidad uterina se hace imprescindible dentro del protocolo de estudio de la pareja infértil.

El factor tubo-peritoneal es en orden de frecuencia, el tercero más invocado en la génesis de la infertilidad, con un 15 a 20%, aunque algunos estudios han reportado cifras hasta del 40% de los casos, precedido únicamente por el factor masculino y el endocrino-ovárico. La génesis en la alteración del factor tubo-peritoneal es diversa y muy variada, pero podría agruparse en dos grandes grupos: 1) *Congénitas*, que incluyen agenesia de las salpinges, ya sea total o segmentaria, estenosis, atresias o duplicaciones, divertículos y orificios accesorios y 2) *Adquiridas*, donde la patología infecciosa es la más frecuente, seguida de la endometriosis, los procesos adherenciales y los tumorales.

El factor endocrino-ovárico se encuentra implicado en el 25-30% de los casos de infertilidad, siendo superado únicamente por el factor espermático. La génesis de

los diversos trastornos de la ovulación, ha sido motivo de tratados completos sobre fisiología, fisiopatología y endocrinología ovárica.

Otro factor involucrado en este tema es el inmunológico el cual tiene una frecuencia baja, 3 al 5% de los casos, debe sospecharse en el varón cuando en ausencia de infecciones seminales demostrables, exista una tendencia exacerbada a la aglutinación de espermatozoides (mayor del 50%) y en la mujer, cuando existan pruebas de penetración del moco cervical alteradas, o bien, cuando se tenga una historia sexual de parejas múltiples. También está indicada cuando no se encuentre ninguna otra causa justificable, antes de considerar una infertilidad como de causa no determinada. Deberán solicitarse anticuerpos anti-espermatozoide IgG e IgM, en suero, aunque también existen técnicas para determinarlos en moco cervical.⁶

El factor masculino se puede encontrar alterado, en porcentajes que oscilan entre el 25 al 50% de los casos. Usualmente, al varón se le ha estudiado en base a dos aspectos fundamentales: los parámetros seminales y la disfunción sexual, sin embargo, existen muchos otros aspectos de estudio que se ubican dentro del ámbito de la andrología (función acrosomal, defectos genómicos, daño por oxidantes, etc.).

El análisis seminal es una parte fundamental en el diagnóstico de la infertilidad siendo la principal herramienta de diagnóstico ya que nos permitirá relacionar sus

resultados con alteraciones clínicas, pero también para la toma de decisiones durante los procesos de Reproducción Asistida.²⁶

Es importante mencionar que el análisis seminal no es lo único que se debe tomar en cuenta para el diagnóstico, en diversos estudios se ha demostrado que los parámetros de concentración espermática, movilidad y morfología, muestran una correlación con el tiempo en que se logra el embarazo. Estos resultados se deben interpretar en conjunto con la historia clínica de los pacientes.^{24,30}

Existen diversos factores que pueden afectar los parámetros seminales, de hecho, se ha postulado que la calidad espermática se ha reducido en los últimos años. Algunos de los factores que se han encontrado como condicionantes son los laborales (exposición a químicos), hábitos (consumo de alcohol, tabaco y drogas), factores ambientales (estrés), la edad y anomalías cromosómicas o genéticas.^{9, 21,22} A pesar de realizar el análisis seminal correctamente y de correlacionar estos datos con una historia clínica adecuada, el factor masculino es poco entendido y se siguen diagnosticando pacientes con infertilidad idiopática.⁶ Se ha reportado una correlación inversamente proporcional entre aneuploidías y parámetros seminales anormales (densidad, movilidad y morfología).^{11, 28,37}

Diversos estudios han encontrado que la infertilidad en pacientes con oligoastenoteratozoospermia (OAT) que tienen un cariotipo sanguíneo normal, tienen aumentada la proporción de espermatozoides con aneuploidías como

consecuencia de anomalías en el complejo sinaptonémico en las células germinales.¹¹

Los parámetros de concentración, movilidad y morfología son los principales indicadores de la función espermática, pero no debe usarse un solo de ellos para realizar un diagnóstico definitivo. Cada uno de ellos se ha relacionado con diferentes alteraciones clínicas, pero también se ha encontrado una relación con edad y la disminución de la calidad espermática en todos sus parámetros.^{17,30, 35}

En el caso de la morfología existen controversias sobre su relación con el embarazo, esto puede deberse a que no existe un criterio de evaluación estandarizado. El criterio de *Kruger* ha demostrado ser el mejor indicador en cuanto a la toma de decisiones en tratamientos de reproducción asistida.^{17,35} En diversos estudios se ha encontrado que un aumento en las anomalías en morfología espermática tiene relación con la fragmentación del ADN, falla parcial o total en la fertilización y anomalías cromosómicas.

Además de un estudio de los parámetros generales, se han desarrollado técnicas que evalúan otros parámetros bioquímicos y de función espermática, como son mediciones enzimáticas, medición de la fragmentación del ADN, etc. Estas pruebas aunadas a la evaluación general nos dan un mejor diagnóstico.

Los daños causados al espermatozoide ocurren principalmente durante la espermatogénesis y espermiogénesis, los cuales pueden observarse durante el estudio seminal, siendo un clásico ejemplo la presencia de la “gota citoplásmica”.

En estudios relacionados con la función espermática y el potencial de fertilización Huszar (2003) estableció que simultáneamente a la extrusión del citoplasma durante la espermiogénesis, también se remodela la membrana plasmática, lo que facilita los sitios de unión de la zona pelúcida y de ácido hialurónico (HA).^{7,17}

Con el desarrollo de técnicas en reproducción asistida, se han logrado sobrepasar algunas barreras que impedían que parejas con factor masculino severo logren el embarazo, pero algunas de estas técnicas conllevan ciertos factores de riesgo. Una de éstas es la Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Es un acuerdo general que los hombres con OAT son candidatos a ICSI, pero tienen mayores niveles de aneuploidías que los normoespérmicos.^{7, 11,23}

En técnicas de reproducción asistida (ART), la presencia de espermatozoides con aneuploidías disminuye los niveles de remodelación de la membrana plasmática y de los sitios de unión a la zona pelúcida, lo cual es un problema cuando se realiza FIVc o inseminación intrauterina (IIU), ya que disminuye la capacidad de fertilización.¹⁸ Sin embargo, esto se ha vuelto relevante con la introducción del ICSI, en donde la barrera de selección del espermatozoide en la zona pelúcida se sobrepasa durante el evento de la fertilización.^{22,36}

Con ICSI se elimina el proceso natural de selección espermatozoide-ovocito, y es reemplazado por la elección aleatoria del embriólogo, por lo tanto, el

espermatozoide que nunca hubiese sido seleccionado por las barreras naturales, ahora es capaz de lograr una fertilización e iniciar la formación del cigoto.²³

La principal aplicación del ICSI es en pacientes con OAT. En diversos estudios se ha demostrado que este tipo de pacientes tienen una mayor probabilidad de tener alteraciones cromosómicas como aneuploidías, las cuales son causa de abortos.

Las anomalías cromosómicas han demostrado tener un impacto negativo en el éxito de programas de fertilización in vitro (FIV-TE). En general, hay mayor incidencia de aneuploidías de cromosomas sexuales en pacientes infértiles que requieren ICSI comparados con los de fertilización in vitro convencional (FIVc).⁷ En general, el porcentaje de malformaciones no difiere de la población general, sin embargo la ICSI se ha relacionado con un aumento de 3 a 4 veces de aberraciones cromosómicas de novo en nacimientos si se compara con FIVc.²³

Por esta razón el uso del ICSI en estos pacientes ha generado un considerable debate en cuanto a los riesgos genéticos de nacimientos con aneuploidías. Colagero y col. (2001) demostraron que en parejas a las que se realiza ICSI y no logran el embarazo tienen una tendencia a un mayor grado de aneuploidías que los que si logran el embarazo, pero se requieren de estudios más extensos para establecer el impacto de las aneuploidías en los resultados de ICSI.⁷

Por lo anterior es importante desarrollar técnicas que ayuden a lograr una mejor selección del espermatozoide.

Marco Teórico.

La espermatogénesis es un proceso complejo de las células germinales masculinas, el cual abarca la proliferación de espermatogonias, meiosis y la espermiogénesis.

Durante la espermiogénesis se elimina el exceso de citoplasma, se forma el acrosoma, el flagelo, todo resultando en la maduración del espermatozoide.¹⁹ Al mismo tiempo que se elimina el citoplasma, también hay una remodelación de la membrana plasmática.¹⁸

Durante la espermatogénesis y espermiogénesis, la apoptosis controla la degradación del ADN del espermatozoide, sugiriendo que tiene un papel importante en el ajuste apropiado del número de proliferación de las células germinales, asociadas a las células de Sertoli que las rodean.⁸

Una fase crítica dentro de la fase final durante la espermiogénesis es la maduración del espermatozoide, donde el citoplasma se acumula alrededor de la pieza intermedia de la espermátide elongada. Este proceso es seguido por la extrusión del citoplasma para alcanzar la madurez del espermatozoide propiamente dicho.^{19,12} Si hay una falla en la remodelación de la membrana, la retención del citoplasma causa que la cabeza sea alargada, redonda o amorfa, y su morfología al momento de la evaluación, evidentemente anormal, es un

indicador de inmadurez espermática. Al mismo tiempo esto afecta la longitud del flagelo, que en general es más corto.^{9, 20}

Para lograr completar estos acontecimientos, el paso esencial es el intercambio de histonas a protaminas. Durante la espermiogénesis, el 85% de las histonas es reemplazado por protaminas, lo que resulta en el empaquetamiento del ADN y la formación de una estructura muy estable debido a la formación de enlaces covalentes (-S-S) y no covalentes (-SH...Zn...SH-).^{5, 31} La unión de protaminas al ADN induce el doblamiento del ADN en coordenadas toroidales (“forma de dona”). Esta forma es muy compacta, teniendo un tamaño de la mitad de lo que logran las histonas, obteniendo una compactación de la cromatina del esperma 6 veces mayor. El empaquetamiento del ADN resulta en cuatro puntos relevantes: 1) Facilita el transporte; 2) protege de daño químico y físico; 3) Lograr una reprogramación adecuada para la fertilización, y 4) sincronización del ciclo celular con el ovocito metafase II (MII) y el espermatozoide en fase G1^{1, 4, 31}

Debido al paso crítico del intercambio de histonas a protaminas, durante la diferenciación de la espermátida a espermatozoide, se podrían esperar aberraciones en la expresión de protaminas o en su estructura, lo que correlaciona con una disminución en la calidad espermática en los parámetros de densidad, movilidad y morfología, teniendo como consecuencia la infertilidad.⁴

Las protaminas son necesarias para el empaquetamiento del ADN durante la espermiogénesis y pueden tener algún significado en otras funciones como la falta

de transcripción.⁴ Son proteínas cargadas positivamente testículo-específicas del núcleo. En humanos a diferencia de otras especies, hay dos tipos de protaminas: Protamina 1 (P1) y Protamina 2 (P2).^{7,8} P1 contiene 50 aminoácidos, siendo rica en arginina y cisterna, mientras que P2 pertenece a la familia de tres proteínas (P2, P3, y P4) que derivan de un gen, el cuál varía en longitud debido a su terminación amino. P2 contiene zinc con una CYS2/HIS2 que es rica en histidina y cisteína; se cree que inhibe la expresión del gen en espermátides tardías.³¹ Estas dos proteínas, deben tener una relación de 1:1, cuando esta proporción es anormal existe una correlación directa con la espermiogénesis. Si hay una traducción temprana de P1, esto causa condensación nuclear prematura, lo que resulta en el arresto de la diferencias de la espermátida; por otra parte si hay deficiencia de P2, hay daño al ADN del espermatozoide y muerte celular temprana. Steger y col (2003), encontraron que una aberración en la proporción P1/P2 está asociada a falla en la penetración y fertilización, además de la falla de activación del ovocito, que puede deberse a que la cromatina este debilitada, o el grado de daño del ADN.^{15, 20, 32} Los pacientes con una proporción anormal de P1/P2, tienen una menor fertilización durante FIV convencional, pero fertilizan normalmente con ICSI. Tomando en cuenta que la expresión de protaminas está asociada con defectos en los estadios tempranos de la fertilización que son sobrepasados por el ICSI, incluyendo la capacitación, la reacción acrosomal, la fusión de membranas con el ovocito y la penetración.

Por lo anterior el efecto de la deficiencia de P2 en la calidad embrionaria sólo se observa en caso de inseminación por ICSI, ya que, en este caso, el embriólogo es

el que selecciona al espermatozoide.^{4,20} Esto es debido a que, se han asociado altos niveles de daño al ADN con deficiencia de P2, ya que ésta inhibe la transcripción de genes durante la espermiogénesis y va a influencia al desarrollo embrionario. Sacas y col (2003), encontraron que una baja calidad del embrión en día 3 (activación del genoma embrionario)^{12,34}, para iniciar el proceso de condensación de la cromatina, a las protaminas las anteceden proteínas nucleares de transición. El primer paso ocurre en las espermátides redondas, e involucra el remplazo de histonas por proteínas de transición (TP1, TP2, HPS1 y HSP2), a continuación, la espermátida se alarga y las proteínas de transición son reemplazadas por protaminas (P1 y P2). El resultado es la condensación de la cromatina y la interrupción de transcripción.^{15,31}

Además de el empaquetamiento de la cromatina y la remodelación morfológica, durante la remodelación de membrana se forman los sitios de unión para el ácido hialurónico (HA), el cuál es un componente del tracto reproductor femenino.^{8,23, 25} Kovanci y col (2001) encontraron que el espermatozoide maduro que se adhiere al HA, no muestra retención del citoplasma y su morfología es normal, además de tener una alta integridad del ADN y una menor frecuencia de aneuploidías.^{20, 25} La remodelación de la membrana facilita la formación de sitios de unión de la zona pelúcida y de HA.^{20, 23,32} En diferentes estudios se ha demostrado que la formación de sitios de unión de HA está relacionado al acrosoma intacto para su capacitación.

Todo esto apoya el concepto de que la unión de HA vía receptores de HA en la membrana plasmática son una evidencia inequívoca de la maduración completa del espermatozoide.²⁰

Otro marcador de la maduración es la Hsp70-2, que es un miembro de la familia de chaperones Hsp70. En ratones se ha demostrado que la ruptura del gen HSP70-2, produce fragmentación del complejo sinaptonémico.⁸ Además estas proteínas también son responsables del transporte, doblamiento de proteínas, como lo son las enzimas reparadoras del ADN y las proteínas de remodelación de la membrana.

El HSP70-2 también tiene una función anti-apoptosis, que se relaciona con las caspasas 3 y 9. La activación de la caspasa 9 se asocia con el citocromo-c que se libera por la mitocondria. Al principio se pensó que era una isoforma de CK-M, pero recientemente se identificó como un chaperón de expresión testicular, la cual se sintetiza en dos olas, donde su mayor expresión ocurre simultáneamente con la extrusión del citoplasma en fase final de la espermiogénesis.^{8,18}

En ratones se demostró que una proteína homóloga de la CK-M, la HspA2, es un componente del complejo sinaptonémico y también facilita el movimiento intracelular de proteína. Esta asociación puede explicar la relación entre los errores de la meiosis, así como las aneuploidías, y tal vez, la presencia de un exceso de citoplasma en espermatozoides con madurez disminuida. Se ha

encontrado que niveles bajos de HspA2 predice la falla en el embarazo en FIV-TE.

7, 8

Las proteínas HspA2 facilitan el transporte intracelular de proteínas en las espermatídes alargadas, la reparación de ADN, y aparentemente soportan la remodelación de la membrana y la eliminación del citoplasma ^{7,20}, por lo que se asocia con retención del citoplasma y por consecuencia con morfología anormal. La fracción de espermatozoides con unión a HA ha completado la remodelación de la membrana y tiene mayor cantidad de receptores, mostrando una menor expresión de citocinas, caspasa 3 y Bcl^{-XL}. ^{18, 20}

Otro marcado bioquímico importante son las CK. En espermatozoides individuales, se mostró que un aumento en las concentraciones de CK, reflejan citoplasma residual. Un cambio en la biosíntesis de ciertas isoformas de CK ocurre simultáneamente con la extrusión del citoplasma y sirven como marcadores independientes de madurez. Las isoformas predominantes en espermatozoides inmaduros son el tipo B, mientras que para los normales prevalece el tipo M. ¹⁸

En el espermatozoide inmaduro, además de una baja expresión de HspA2 y la falla de la remodelación de la membrana, la retención del citoplasma causa que la cabeza sea alargada, redonda, amorfa, y por lo tanto que su morfología sea anormal, la cabeza aumenta de tamaño y la longitud del flagelo es menor, aumentado la actividad de CK-B. ³¹

En diversos estudios Huszar y col, han demostrado que la correlación entre la disminución de la actividad de CK y el aumento de HspA2, en una segunda oleada de la síntesis y la pérdida del citoplasma, está relacionada con eventos de la espermiogénesis. Se encontró que la disminución de HspA2 y el aumento de CK fueron consistentes con la disminución de la fertilidad.^{20,21} También encontraron que la actividad de CK es espermatozoides individuales, es consecuencia del aumento de la concentración de proteínas citoplásmicas, entrándose una actividad elevada en hombres con fertilidad disminuida.^{18, 20,23}

Debido a la ambigüedad entre la morfología espermática y la maduración celular, tomar éste parámetro combinándolo con otros marcadores bioquímicos, puede dar un mejor diagnóstico, ya que la medición de niveles de CK y la retención citoplásmica han probado ser un factor predictivo de embarazo,^{12, 16,18} esto se demostró por Kovanci y col (2001), donde sólo los espermatozoides sin retención del citoplasma fueron capaces de unirse la zona pelúcida.^{23,25} Aunado a lo anterior, existe una correlación importante entre la proporción de espermatozoides inmaduros y disomías.⁷

En diversos estudios se ha encontrado que la maduración en pacientes normoespérmicos, comparada con pacientes con concentraciones disminuidas (20 a 30 Millones/ml) es diferente de los que tienen cuentas mayores a 30 Millones/ml. En aproximadamente un tercio de los hombres con muestras entre 20 y 30 millones, hay una mayor proporción de actividad de la CK y HspA2.²¹

Existen muchas proteínas que participan en la distribución durante la gametogénesis, la maduración del espermatozoide, su función durante la meiosis y la fertilización, así como en estados post-fertilización.¹⁹

Los hombres que portan formas mutadas de varios tipos de genes pueden ser estériles. Un ejemplo es el gen DBY, que codifica a VASA RNA helicasa, que se localiza en el cromosoma T, y está implicado en la espermiogénesis en pacientes con azoospermia. Diversos estudios han dado una lista de 12 genes principales que se han clasificado por su localización, defectos citológicos por RNAi, fenotipos y evidencia de sus funciones en la fertilidad, pero aún falta probar cerca de 70 proteínas y sus genes en humanos.

Una de las principales proteínas que se identificó fue TOP-1, el cual se encuentra alrededor de la cromatina espermática y en ratones transgénicos con ausencia del gen, produce anomalías del núcleo del espermatozoide y un paso irregular a través de la meiosis. Es una topoisomerasa. El RNAi de TOP-1 origina un núcleo de la cromatina anormalmente alargado y una aberración en su progresión a través de la meiosis en el hombre.¹⁹

Cuando falla alguna de las proteínas con sus respectivos genes, y la serie de elementos y eventos que involucra la maduración espermática, esto puede llevar a la fragmentación del ADN y por lo tanto a errores anteriormente mencionados. El aumento de fragmentación retarda el reemplazo de histonas por protaminas.⁸ Un gran número de estudios han demostrado que una proporción de espermatozoides

con ADN fragmentado aparece más en hombres infértiles comparado con los controles fértiles.^{29,34}

Aunque la importancia de la fragmentación del ADN está bien establecida en reproducción, es importante subrayar los mecanismos responsables de la inducción de fragmentación, que aún no son bien comprendidos.^{2,7, 30} La ruptura del ADN puede ser el resultado de una espermiogénesis defectuosa, por la falta de reparación del ADN, por estrés oxidativo y por aneuploidías como parte de los mecanismos de control genómico, desarrollados para inactivar genéticamente el espermatozoide con defectos genómicos.^{10, 29}

Usando el modelo bovino, Fatehi y col (2006), demostraron que los gametos con daño en el ADN no afectan el desarrollo embrionario hasta después de la división celular cuando se activa el genoma embrionario, lo cual es debido al hecho de que antes de la activación, el RNAm que está presente en el citoplasma, es el materno. Sin embargo, cuando inicia la expresión génica en la segunda o tercera división se observa la formación anormal del huso mitótico.

La fragmentación del ADN también ocurre en este punto, y genera severos problemas en el desarrollo embrionario de los embriones que por lo mismo, no alcanzan a llegar al estadio de blastocisto.

A pesar del aumento de fragmentación y anormalidades cromosómicas, no necesariamente un espermatozoide con estructura anormal tiene una constitución

anormal de cromosomas, y por lo tanto, no es de sorprenderse que muchos bebés normales hayan nacido después del uso del ICSI.^{2,15}

Tanto los marcadores bioquímicos como los morfológicos están relacionados. En el caso de la morfología las características para tomar como normal un espermatozoide son: cabeza oval y simétrica, con distribución del acrosoma de 40-70% de la cabeza, la inserción del flagelo debe ser central (alineado con la cabeza). Las variaciones de anomalías del esperma incluyen aquellas donde la cabeza sea asimétrica, amorfa, alargada, la pieza intermedia ensanchada, cabezas y/o colas múltiples, etc. En general, la mayoría de los laboratorios utiliza los criterios de la OMS, con la variación de evaluación de morfología con el criterio estricto.⁹

Como ya se ha mencionado, la morfología de la cabeza está asociada con anomalías cromosómicas. En el caso de pacientes con OAT, todos los parámetros seminales están afectados y tienen aumentada la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas, lo que sugiere que tienen una mayor proporción de gametos aneuploides, aún en hombres infértiles con cariotipos normales, también tienen un alto riesgo de aneuploidías, particularmente en cromosomas sexuales.^{9,25}

Las muestras seminales con cabezas alargadas, se han asociado con un aumento significativo de aneuploidías. Como hemos visto anteriormente, estas características correlacionan con la falta de madurez del espermatozoide

(marcadores bioquímicos), anormalidades cromosómicas, y fragmentación del ADN (proteínas apoptóticas), resultando en infertilidad.^{8,34} La infertilidad en estos casos es debida a la falla en la fertilización principalmente. Durante la fertilización uno de los eventos más importantes es la interacción entre el espermatozoide y el ovocito, la cual actúa como barrera de selección en casos in vivo, y en los casos in vitro, esto afecta cuando se realiza FIVC o inseminación intrauterina (IIU), como ya se mencionó.^{2,33}

En el caso de ICSI, se “salta” esta barrera, cuando el espermatozoide para inseminación es seleccionado por el embriólogo³¹, lo cual es convierte en un punto de gran importancia debido a que la principal indicación para el ICSI es para pacientes con anormalidades espermáticas, especialmente pacientes con OAT, pero es importante mencionar que no en todos los casos donde se realiza ICSI se usan espermatozoides anormales, y que el embriólogo, con un entrenamiento adecuado, siempre va a seleccionar espermatozoides normales o lo más cercano a lo normal. Ya se ha demostrado que aún con anormalidades espermáticas, la falla completa de fertilización con ICSI es poco común, y en muchos casos puede deberse a la falla en la activación del ovocito, o a problemas propios del ovocito.^{2, 5, 10}

Para la evaluación espermática no se puede olvidar que los parámetros tanto de concentración como de movilidad también son importantes y que correlacionan en muchos de los casos con diferentes marcadores bioquímicos^{9,10, 26}

Resumiendo, podemos afirmar que existe una relación establecida entre la morfología y los marcadores bioquímicos para establecer la madurez espermática, basados en principios biológicos y moleculares dentro de la espermiogénesis. Dicha asociación, provee un gran valor para una mejor evaluación. A partir de estos principios, se logró desarrollar la técnica de PICSI (nombre comercial), la cual se basa en estos conceptos. Se desarrolló en un principio como prueba complementaria en el análisis seminal, pero actualmente se usa para seleccionar espermatozoides maduros durante el procedimiento de ICSI y consiste en una caja petri que contiene anillos de HA donde se une la cabeza del espermatozoide. Aquellos espermatozoides que se adhieren a HA y continúan con movilidad del flagelo, son los que se seleccionan para la inyección (ICSI).

Objetivo.

Comparar los resultados de fertilización, segmentación y embarazo entre la técnica de PICSI vs ICSI.

Material y Métodos.

Estudio prospectivo, realizado en el centro especializado para la atención de la mujer en el Hospital Ángeles Lomas, donde se evaluaron 11 pacientes a los que se les realizó la técnica de PICSI. Este estudio se dividió en dos partes.

En la primera se compararon los resultados de fertilización y segmentación entre pacientes a los que se les realizó ICSI sin embarazo y cuando se les realizó otro ciclo posterior, se realizó PICIS (mismos pacientes, diferentes ciclos).

En la segunda parte se compararon pacientes a los que se les realizó PICSI con pacientes del mismo período a los que se les realizó ICSI, con características seminales similares a los de PICSI (diferentes pacientes, con ciclos en el mismo periodo).

Las muestras seminales se obtuvieron por masturbación, el día de la captura ovular. Se dejaron licuar por 20 minutos antes de iniciar su evaluación y capacitación in vitro. Se utilizaron los criterios de la OMS para su evaluación general, con excepción de la morfología que se evaluó con el criterio estricto (Kruger). Las muestras se capacitaron con la técnica de *swim-up*, los datos de las características seminales generales se muestran en la tabla 1.

La clasificación ovocitaria se realizó al sistema de evaluación desarrollado en nuestra clínica. Se califica cada característica del ovocito y se saca un promedio

por ovocito. Cuando se tiene el promedio de cada ovocito, se saca el promedio de la cohorte de cada paciente. Para el análisis estadístico en este estudio se utilizó T de Student.

Resultados.

En la primer parte del estudio, no se encontró diferencia significativa con los parámetros demográficos.

A éstos pacientes se les realizó ICSI, y no se logró el embarazo, por lo que cuando repitieron posteriormente otro ciclo, se realizó PICSI. Comparando los ciclos, tuvieron diferencia significativa tanto en fertilización como en segmentación, lográndose un 37.5% de embarazo cuando se realizó PICSI (figura 1).

En la segunda parte del estudio, se compararon los casos a los que se realizó PICIS con el grupo de pacientes a los que sólo se realizó ICSI, con las mismas características seminales (tabla 2).

La tasa de fertilización fue mayor cuando se realizó PICSI que con ICSI no así para segmentación, aunque la diferencia no fue significativa (figura 2). Los valores seminales no tuvieron diferencias, pero cuando se realizó PICSI se obtuvo una mejor tasa de embarazo que con ICSI (figura 3).

Gráficas

Tabla 1. Datos de las muestras seminales pre y post-capacitación

	PICSI	ICSI	PICSI	ICSI
	muestra en fresco		muestra post-capacitación	
Volúmen (mL)	2.45	2.54	0.29	0.27
Densidad (mill/mL)	49.00	43.64	31.27	52.44
IM (%)	49.00	47.25	74.36	75.29
MT (%)	60.73	58.39	82.55	80.75
Morfología normal (%)	2.64	2.64	---	---

Tabla 2. 2a. Parte del estudio: Características demográficas entre grupos

VARIABLE	PICSI	ICSI	p=
N=	11.00	28.00	
Edad	36.09	37.07	0.60
IMC	25.56	24.42	0.52
DOSIS	2281.82	2052.61	0.64
# Embriones transferidos	2.27	2.32	0.89
NL	2.64	2.64	0.99
Anorm Cabeza (%)	42.82	42.32	0.85

p<0.5

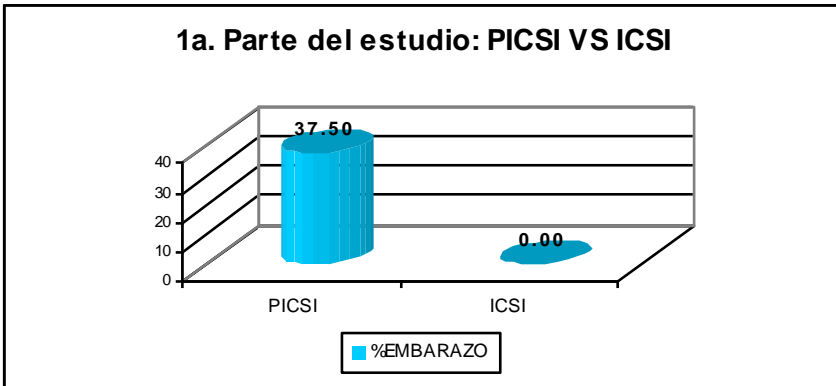
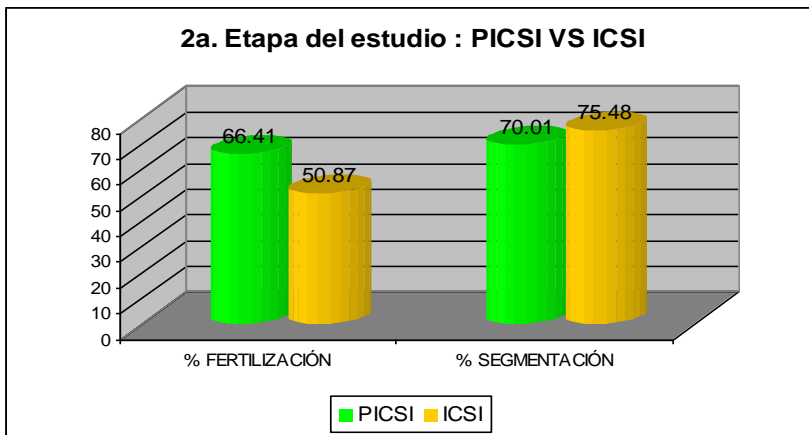


Figura 1. Embarazo con PCSI después de un intento fallido con ICSI.



VARIABLE	PICSI	ICSI	p=
Fertilización (%)	66.41	50.87	0.12
Segmentación (%)	70.01	75.48	0.56

p<0.5

Figura 2. Resultados de fertilización y segmentación en la 2a. Etapa del estudio

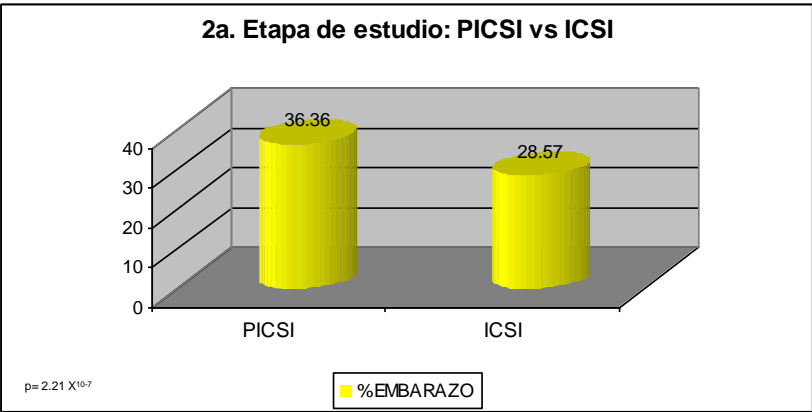


Figura 3. Tasa de embarazo entre grupos de la 2a. Etapa de estudio

Comentario.

Con mucha frecuencia, el ginecólogo da por hecho que las parejas que lo consultan, poseen conocimientos básicos sobre el ciclo menstrual y la fertilidad en la especie humana. No obstante, es verdaderamente alarmante el desconocimiento y la mala información que prevalece en nuestra sociedad, aún en los estratos socio-culturales altos.

Por lo anterior, es muy conveniente que dediquemos todo el tiempo necesario para hacer una anamnesis cuidadosa y detallada, sobre todos estos aspectos, ya que con una frecuencia mayor a la esperada, las parejas que nos consultan, no tienen una adecuada exposición al embarazo por desconocimiento.

La microinyección de espermatozoides directamente al citoplasma del ovocito, ha sido utilizada desde los años 60, ya en 1976, se demostró la habilidad del espermatozoide y del núcleo espermático, de diferentes especies, para fertilizar ovocitos heterogéneos, esto mediante la inyección de espermatozoides humanos a ovocitos de hámster, dando como resultado, la formación de un pronúcleo masculino y uno femenino. Con esto, se concluyó que la interacción entre la superficie de membrana del gameto masculino, con el gameto femenino, no era necesaria para que se llevara a cabo la fertilización, una vez que sobrepasa la zona pelúcida, que es la primera barrera del ovocito.

El primer nacimiento reportado con ICSI, fue en el conejo, en 1988. Este resultado dio lugar a la investigación de la infertilidad en humanos, por factor masculino, utilizando como tratamiento el ICSI.

El primer embarazo por esta técnica en humanos, fue logrado en 1992, Esto fue seguido por una sucesión de reportes, indicando que el ICSI es una técnica apropiada y exitosa para el tratamiento de la infertilidad por factor masculino. La técnica de ICSI ha reemplazado, progresivamente, a las técnicas previas de micromanipulación de gametos

Conclusión.

Partiendo de la base de que la reproducción asistida tiene como finalidad última, la de lograr la concepción, desarrollo y nacimiento de un ser humano sano, lo primero que tendríamos que hacer, es cerciorarnos de que la pareja a la que vamos a estudiar, sea una pareja con adecuado estado de salud.

Para ello, es imprescindible la realización de una serie de estudios básicos generales, para determinar el adecuado estado de salud. Éstos deberán incluir: biometría hemática, química sanguínea, examen general de orina, urocultivo, placa de tórax, consentimiento informado para la detección de VIH., antígenos contra hepatitis, además de todos los estudios e interconsultas que se consideren pertinentes, de acuerdo a la impresión clínica inicial.

Por otro lado, es importante la evaluación del riesgo pregestacional de cada pareja en particular, el cual, variará de acuerdo a la edad de ambos, así como sus antecedentes personales y padecimientos actuales.

Una vez establecido el diagnóstico del estado de salud de la pareja y no encontrando contraindicaciones para el embarazo, es imprescindible realizar el estudio de todos y cada uno de los factores conocidos, implicados en la génesis de la infertilidad. Aunque como ya vimos el mayor porcentaje de los casos de infertilidad encuentran su causa entre los factores masculinos, endocrino-ováricos y tubo-peritoneales, el protocolo de estudio de la pareja infértil, deberá llevarse a cabo siempre de manera sistemática y completa en todos los casos. La única salvedad que exculpa al clínico para no realizar el protocolo de manera completa, es que la pareja se embarace antes de haberlo concluido.

Debido a que las tasas tan exitosas que se han obtenido con ICSI, las cuales son tan similares o incluso más altas, comparadas con la FIV convencional; muchos de los centros autorizados han extendido el tratamiento del ICSI y actualmente PICSI.

En el presente trabajo se obtuvo una mayor tasa de fertilización cuando se realizó la técnica de PICSI. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde, al seleccionar a los espermatozoides maduros, por medio de marcadores bioquímicos (HA), se reducen las posibilidades de inyectar espermatozoides con

aneuploidías o fragmentación del ADN, que resultaría en menores tasas no sólo de fertilización, también de embarazo.^{7,20}

Podemos concluir que la selección espermática con marcadores bioquímicos, siempre y cuando se tome en cuenta también la evaluación de la morfología, es una buena alternativa de selección para lograr no sólo mejores tasas de fertilización, también de embarazo, lo que es nuestro principal objetivo cuando se realizan técnicas de reproducción asistida.^{10, 16}

Bibliografía.

1. **Agarwal A, Said TM.** Sperm chromatin assessment. Cap 7. Textbook of Assisted Reproductive Techniques 2001.
2. **Agarwal A, Varghese AC, Goldberg E, Agarwal A.** Current and future perspectives on intracytoplasmic sperm injection: a critical commentary. *Reprod BioMedicine Online* 2007; 15(6): 719-727.
3. **Andrea M I, Pozza C, Gianfrilli D, Isidoro A.** Medical treatment to improve sperm quality . *Reprod BioMed Online* 2006; 12(6): 704–714.
4. **Aoki VW, Liu L, Jones KP y col.** Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril* 2006;86:1408 –15.
5. **Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrel DT.** Protamine Levels Vary Between Individual Sperm Cells of Infertile Human Males and Correlate With Viability and DNA Integrity. *J Andrology* 2006; 27(6):890-897.
6. **Björndahl L, Haugen TB.** The information contained in a semen analysis. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2008 ;31;128(3):320-3.
7. **Burrello N, Vicari E, Shin P y col.** Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmers. *Hum Reprod* 2003; 18(7):1371-1376.
8. **Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G.** Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in

mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004; 10 (5):365-372.

9. **Celik-Ozenci C, Catalanotti J, Jakab A y col.** Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for FISH: shape analysis and objective morphometry. *Biol Reprod* 2003;69:1347-1355.
10. **Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T y col.** Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 2004;19(9):2052-2059.
11. **Calogero AE, De Palma A, Grazioso C y col.** High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum. Reprod* 2001; 16:1433-1439.
12. **Cho C, Jung-Ha H, Willis WD y col.** Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 2003; 69: 211–217.
13. **Ebner T, Moser M, Sommergruber M et al.** Complete oocyte activation failure after ICSI can be overcome by a modified injection technique. *Hum Reprod* 2004; 19: 1837–1841.
14. **Estévez GS, Carballo ME, Durán ML, Kably A.** Morfología de la cohorte ovocitaria: propuesta de una clasificación pronóstica para la obtención de embarazo en fertilización in vitro y transferencia de embriones (FIV-TE). *Ginecol Obstet de México* 2006; 74, Suplemento 2006.
15. **Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E et al.** DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Andrology* 2006; 27: 176–188.

16. **Gergely A, Kovanci E, Senturk L, Cosmi E, Vigue L, Huszar G.** Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. *Hum Reprod* 1999; 14(8):2007-2014.
17. **Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P y col.** Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med.* 2001; 8; 345(19):1388-93.
18. **Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD.** Sperm Plasma Membrane Remodeling during Spermiogenetic Maturation in Men: Relationship among Plasma Membrane 1, 4-Galactosyltransferase, Cytoplasmic Creatine Phosphokinase, and Creatine Phosphokinase Isoform Ratios'. *Biol Reprod* 1997; 56:1020-1024.
19. **Huszar G, Stone K, Dix D and Vigue L.** Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* 2000; 63:925-932.
20. **Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L.** Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl 3):1616 –24.
21. **Huszar G, Celik-Ozenci C, Cayli C, Kovacs T, Vigue L, Kovaci E.** Semen Characteristics after Overnight Shipping: Preservation of Sperm Concentrations, HspA2 Ratios, CK Activity, Cytoplasmic Retention, Chromatin Maturity, DNA Integrity, and Sperm Shape. *J Andrology* 2004; 25.

22. **Jakab A, Kovacs T, Zavaczki Z y col.** Hum Reprod 2003; 18(7):1481-1488.
23. **Jakab A, Sakkas D, Delpiano E y col.** Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidias. Fertil Steril 2005;84:1665–73.
24. **Kalyani R, Basavaraj PB, Kumar ML.** Factors influencing quality of semen: a two year prospective study. J Pathol Microbiol 2007; 50(4):890-5.
25. **Kovanci E, Kovacs T, Moretti E y col.** FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. Hum Reprod 2001; 16(6):1209-1217.
26. **Lackner JE, Lakovic E, Waldhör T, Schatzl G, Marberger M.** Spontaneous variation of leukocytospermia in asymptomatic infertile males. Fertil Steril. 2007 ; 3:1-4.
27. **Maruyama R, Singson A.** Taking care of Dad's DNA. Genome Biology 2006, 7:124.
28. **Mateu E, Rodrigo L, Prados N y col.** High Incidence of Chromosomal Abnormalities in Large-Headed and Multiple-Tailed Spermatozoa. J Andrology 2006; 27(1):6-10.
29. **Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gonsálvez J, Álvarez JG, Fernández JL.** Increased Aneuploidy Rate in Sperm With Fragmented DNA as Determined by the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test and FISH Analysis. J Androl 2001; 28.

30. **Nallella KP, Sahrma RK, Aziz N ,Agarwal A.** Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril* 2006; 85:3.
31. **Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S y col.** Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reproductive BioMedicine Online* 2004; 9(6):652–658.
32. **Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K, Al-Hasani S.** DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod BioMedicine Online* 2007; 14(3): 384-395.
33. **Pieczenik G, Garrisi J, Cohen J.** Inhibition of human spermatozoa–zona pellucida binding by a combinatorially derived peptide from a synthetic target. *Reprod BioMedicine Online* 2006;13(3): 361–367.
34. **Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N y col.** Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod BioMedicine Online* 2003;7: 428–432.
35. **Saxena P, Misro MM, Chaki SP, Chopra K, Roy S, Nandan D.** Is abnormal sperm function an indicator among couples with recurrent pregnancy loss? : *Fertil Steril.* 2007; 29: 1-5.
36. **Van Dyk Q, Lanzendorf S, Kolm P, Hodgen GD and Mahony MC.** Incidence of aneuploid sperm from subfertile men: selected with motility versus hemizona-bound. *Hum. Reprod* 2000; 15 (7):1529-1536.
37. **Vegetti W, Van Assche E, Frias A y col.** Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod.* 2000; 15:351–365.

38. **Viville S, Mollard R, Bach ML.** Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies? case report. *Human Reproduction* 2000;15: 2563–2566.