



Revista Internacional de
Andrología

www.elsevier.es/andrologia



ORIGINAL

Estudio de los daños estructurales tras la inmovilización espermática previa a la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides en sujetos teratozoospermicos



María José Gómez-Torres^{a,*}, Eva María García^{a,b}, Jaime Guerrero^b,
Jose Luis Girela^a, Jorge Ten^{a,b}, Rafael Bernabeu^b y Joaquín De Juan^a

^a Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, Alicante, España

^b Departamento de Biología Reproductiva y Medicina, Instituto Bernabeu, Alicante, España

Recibido el 5 de septiembre de 2013; aceptado el 2 de noviembre de 2013

Disponible en Internet el 14 de enero de 2014

PALABRAS CLAVE

Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides; Inmovilización; Teratozoospermia; Ultraestructura; Reacción acrosómica; Fragmentación ácido desoxirribonucleico

Resumen

Objetivo: Describir y comparar las alteraciones ultraestructurales que puede provocar la inmovilización espermática previa a la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides, así como los daños en el ADN y el estado del acrosoma en espermatozoides de sujetos teratozoospermicos y normozoospermicos.

Material y métodos: Se utilizaron 15 muestras seminales procedentes de donantes normozoospermicos y 20 muestras de pacientes teratozoospermicos del Instituto Bernabeu de Alicante. Para el estudio con microscopía electrónica de transmisión se utilizaron ovocitos humanos como receptáculo de los espermatozoides. La fragmentación del ADN se valoró mediante la técnica TUNEL, y el estado del acrosoma, utilizando la lectina *Pisum sativum* conjugada con FITC. El análisis estadístico entre los diferentes grupos se realizó mediante un test ANOVA.

Resultados: Los resultados mostraron que, tras la inmovilización, los espermatozoides procedentes tanto de sujetos normozoospermicos como de teratozoospermicos sufrieron las mismas alteraciones ultraestructurales a nivel de la membrana plasmática y acrosomal. Tras valorar la fragmentación de ADN mediante TUNEL observamos que en los espermatozoides inmovilizados el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado era similar en ambos grupos (normozoospermicos vs. teratozoospermicos). En cambio, el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica fue significativamente más elevado en los inmovilizados que en el grupo control, tanto en los sujetos normozoospermicos como teratozoospermicos.

Conclusión: Los resultados de este estudio evidencian que los daños estructurales provocados por la inmovilización, en espermatozoides procedentes de sujetos normozoospermicos y teratozoospermicos, son independientes de la morfología espermática. Y además, dicho proceso no

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mjose.gomez@ua.es (M.J. Gómez-Torres).

provoca fragmentación del ADN. Sin embargo, la inmovilización tanto en el grupo de los sujetos normozoospermicos como teratozoospermicos provoca una inducción mecánica de la reacción acrosómica.

© 2013 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Intracytoplasmic sperm injection; Immobilization; Teratozoospermic; Ultrastructure; Acrosome reaction; Deoxyribonucleic acid fragmentation

Study of structural damage after sperm immobilisation prior to intracytoplasmic sperm injection in teratozoospermic males

Abstract

Objective: To describe and compare the ultrastructural alterations, DNA fragmentation and acrosome status that could cause sperm immobilisation prior to intracytoplasmic sperm injection, in samples from normozoospermic and teratozoospermic males.

Material and methods: For this study we used 15 sperm samples from consenting normozoospermic donors and 20 samples from teratozoospermic males, submitted for assisted reproduction at Instituto Bernabeu of Alicante. To assess the ultrastructural alterations induced by immobilisation, human oocytes were used as containers for spermatozoa and then observed by transmission electron microscopy. DNA fragmentation was assessed using TUNEL and acrosome status using fluorescein isothiocyanate-conjugated *Pisum sativum* agglutinin. The control group consisted of sperm without manipulation. Statistical analysis between groups was performed by ANOVA.

Results: The results showed that immobilised spermatozoa presented the same damage in plasma and acrosomal membranes in the samples from both normozoospermic and teratozoospermic subjects. After assessing DNA fragmentation in the cells from normozoospermic and teratozoospermic patients by the TUNEL technique, we observed that the percentage of spermatozoa with DNA fragmentation did not increase in the immobilised group compared with the control group. However, the percentage of acrosome-reacted sperm was significantly greater in immobilised spermatozoa than in the control group in both normozoospermic and teratozoospermic males.

Conclusion: The results of this study show that the structural damage caused by immobilisation in spermatozoa from teratozoospermic and normozoospermic males is independent of sperm morphology. In addition, the immobilisation does not cause DNA fragmentation. However, the percentage of acrosome-reacted sperm was greater in the immobilised group than in the control group, in both normozoospermic and teratozoospermic subjects.

© 2013 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La esterilidad afecta al 10-15% de las parejas¹, siendo el factor masculino responsable en aproximadamente el 50% de los casos². La incorporación de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)^{3,4} como técnica de rutina supuso una enorme revolución en el campo de la medicina reproductiva, al solucionar la mayor parte de las causas de esterilidad debidas a un factor masculino.

Actualmente, la ICSI es la técnica de reproducción asistida por excelencia, empleada en la mayoría de los tratamientos de infertilidad por todo el mundo. No obstante, y a pesar de que es una técnica de reproducción más invasiva que la fecundación *in vitro* convencional y que la micro-manipulación de los gametos, podría inducir determinados riesgos genéticos y epigenéticos⁵. Su uso se está efectuando en muchas clínicas de reproducción asistida de manera indiscriminada. Entre los años 1999 y 2004 el empleo de la ICSI se incrementó de forma drástica pasando de un 11,0 a un 57,5%, mientras que el porcentaje de parejas con esterilidad atribuida a un factor masculino se mantuvo estable^{6,7}.

La inmovilización del espermatozoide, previa a la ICSI, es un paso esencial para que ocurra la fecundación^{8,9}, ya que permite la desestabilización y permeabilización de la membrana plasmática^{10,11}. Algunos autores han observado que la inmovilización espermática y la permeabilización de la membrana plasmática mejoran los porcentajes de fecundación^{12,13}, ya que esta manipulación facilita la descondensación nuclear tras la inyección del espermatozoide⁹, así como la liberación del hipotético factor espermático soluble, que induce la activación del ovocito¹⁴. La inmovilización espermática se realiza, generalmente, mediante procedimientos mecánicos o físicos. Sin embargo, la técnica más utilizada en ICSI suele ser la inmovilización mecánica conocida como convencional o *squeezing*^{12,15-17}, que consiste en dar un golpe, con la pipeta de microinyección, en el flagelo del espermatozoide. En este sentido, diversos estudios muestran que la inmovilización mecánica es una técnica invasiva, ya que contacta directamente con el espermatozoide aplicando la fuerza sobre la pieza intermedia, lo que podría generar importantes alteraciones a nivel celular. Nosotros hemos descrito algunas de estas

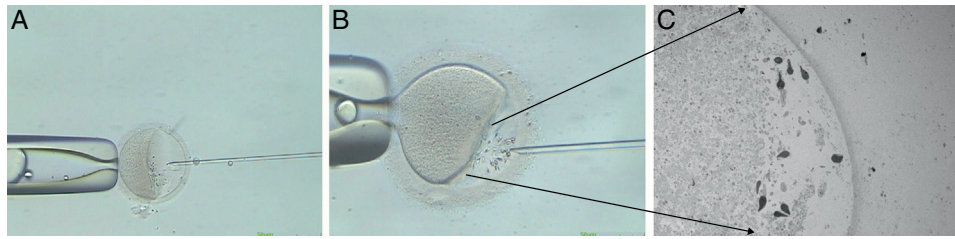


Figura 1 Procedimiento experimental donde se ilustra la microinyección de los espermatozoides en el espacio perivitelino de los ovocitos humanos. A y B) Microfotografías de microscopía óptica de ovocito humano metafase I con espermatozoides en el espacio perivitelino, x50 y x100. C) Microfotografía de microscopía electrónica de transmisión de ovocito metafase I con espermatozoides en espacio perivitelino, x970.

alteraciones producidas en los espermatozoides humanos, inmovilizados mediante la técnica convencional o *squeezing*, utilizando la microscopía electrónica de barrido y la microscopía confocal¹⁸.

Está demostrado que en casos en los que existe un factor masculino severo, azoospermia con espermatozoides de biopsia testicular, criptozoospermia, oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia, con la ICSI se obtienen muy buenos resultados¹⁹. En todas estas afecciones, la inmovilización de los espermatozoides, previa a la ICSI, se realiza utilizando la misma metodología, sin tener en cuenta las características citomorfológicas de las muestras. En base a esto, el objetivo principal de este trabajo fue describir los daños ultraestructurales, fragmentación del ADN y estado del acrosoma que la inmovilización espermática, previa a la ICSI, provoca en los espermatozoides procedentes de sujetos teratozoospermicos y normozoospermicos. Pero uno de los inconvenientes que nos encontramos a la hora de estudiar pocas células con el microscopio electrónico de transmisión (MET) es la forma de visualizarlos. Para ello, y de forma novedosa, en este trabajo empleamos ovocitos humanos como receptáculos de los espermatozoides inmovilizados para asegurarnos su visualización al MET.

Material y métodos

Las muestras de semen que se incluyeron en el estudio se obtuvieron de 15 donantes voluntarios normozoospermicos y de 20 pacientes teratozoospermicos, del Instituto Bernabeu (Alicante, España). Las muestras fueron obtenidas tras 3-5 días de abstinencia, y el diagnóstico de las mismas fue evaluado siguiendo las normas de la OMS. Todos los pacientes firmaron previamente el consentimiento informado.

Para cada muestra se establecieron 2 grupos de entre 100 y 200 espermatozoides móviles, capacitados mediante la técnica de *Swim-up* y ajustados a una concentración final de 3×10^6 espermatozoides/mL. Los espermatozoides fueron inmovilizados mediante *squeezing* en su pieza principal del flagelo (grupo inmovilizados). El grupo control consistió en espermatozoides móviles, que no habían sido manipulados, pero hay que resaltar que estuvieron a las mismas condiciones experimentales (tiempo, temperatura) que los espermatozoides del grupo anterior durante el proceso de inmovilización.

Para poder visualizar los espermatozoides en el MET se usaron como receptáculos ovocitos humanos, inmaduros o

de fallos de fecundación *in vitro* (los cuales no presentaron evidencias de pronúcleos después de las 48h de la fecundación). Los ovocitos se obtuvieron de mujeres incluidas en el programa de reproducción asistida del Instituto Bernabeu de Alicante. Todas las pacientes firmaron previamente el consentimiento informado.

Aproximadamente 200 espermatozoides de cada muestra, previamente inmovilizados, fueron aspirados en una pipeta de ICSI y microinyectados en el espacio perivitelino de los ovocitos. El mismo número de espermatozoides del grupo control fueron inyectados en los ovocitos de la misma forma, pero sin la manipulación previa. Dicho procedimiento puede observarse en la [figura 1](#).

Después de la inyección, los ovocitos fueron fijados al 2% de glutaraldehído e incluidos en resina LR White™. Los bloques fueron cortados en un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT® (Leica Microsystems GmbH, Viena, Austria), con cuchilla de diamante. Las rejillas fueron teñidas con acetato de uranilo y examinadas con MET (Philips Tecnai™ 12, Ámsterdam, Países Bajos).

El estado de fragmentación del ADN espermático fue evaluado mediante la técnica TUNEL²⁰ (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Biochemicals, Mannheim, Alemania). El porcentaje de espermatozoides capacitados con fragmentación de ADN se determinó usando un microscopio confocal (Leica DM IRBE2, Solms, Alemania), empleando un objetivo con aceite de inmersión 1000X. Cada muestra fue analizada por duplicado y en cada experimento se realizaron controles positivos y negativos. Los resultados se expresaron como porcentajes (%) de espermatozoides con fragmentación de ADN.

Para la valoración de la reacción acrosómica, los espermatozoides fueron fijados y permeabilizados en metanol. A continuación se incubaron durante 30 min con la lectina *Pisum sativum* conjugada con FITC (PSA-FITC; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE. UU.), tras realizar 3 lavados en PBS, las preparaciones se montaron con el medio VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE. UU.) y fueron observadas con un microscopio confocal (Leica DM IRBE2). Se contaron 200 células en cada uno de los casos y se establecieron 2 patrones: espermatozoides reaccionados y espermatozoides sin reaccionar²¹.

Una vez comprobado que los resultados obtenidos se ajustaban a una distribución normal se realizó un análisis de la varianza para comparar las posibles diferencias. Todos los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS® 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

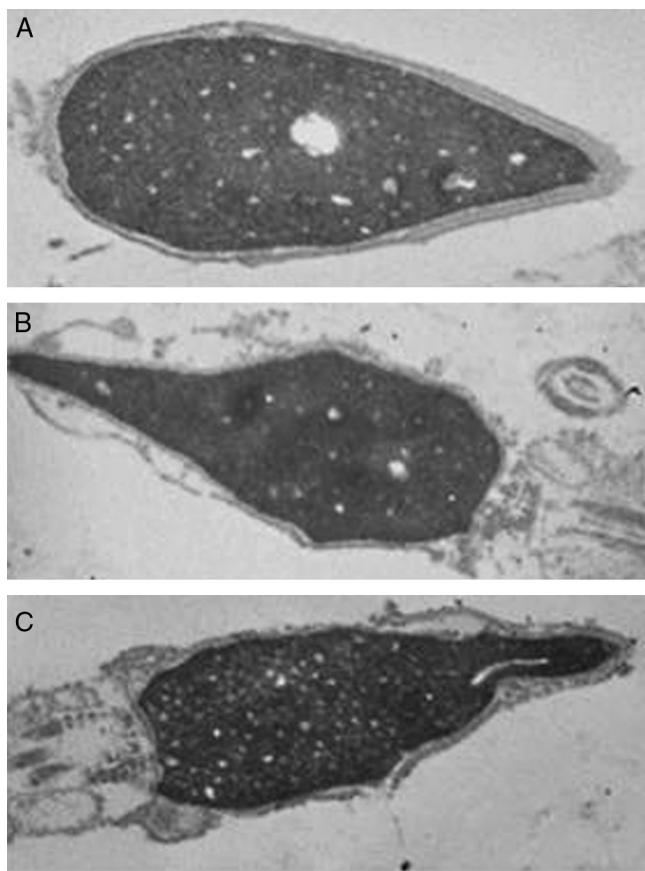


Figura 2 Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión de espermatozoides humanos. A) Cabeza morfológicamente normal. B y C) Cabezas con daño a nivel de la membrana plasmática y membranas acrosomales, x21.000.

Resultados

Alteraciones ultraestructurales observadas con microscopio electrónico de transmisión

De cada uno de los casos, se introdujeron entre 100-200 espermatozoides en el interior de los ovocitos; al procesarlos y visualizarlos al MET, la media de espermatozoides analizados fue de entre 50-60 células.

En el grupo control, tanto en sujetos normozoospermicos como teratozoospermicos, en el 100% de las células espermáticas analizadas no se observaron alteraciones a nivel ultraestructural. Tal y como se muestra en la [figura 2A](#), la cabeza espermática de dichos gametos presentó la membrana plasmática íntegra, el acrosoma intacto, una envoltura nuclear normal y un núcleo sin fragmentación aparente. En las secciones donde pudimos visualizar la pieza intermedia, comprobamos que su estructura no presentaba ninguna alteración. De la misma forma, a nivel del axonema pudimos observar que la organización de los microtúbulos fue correcta, al igual que la disposición de la vaina fibrosa.

Las alteraciones ultraestructurales provocadas por la inmovilización de los espermatozoides procedentes tanto de los sujetos normozoospermicos como teratozoospermicos fueron las mismas. El 90% de las células estudiadas

presentaron daños a nivel de la membrana plasmática, así como de las membranas acrosomales ([fig. 2B y C](#)). La mayoría de estos gametos presentaron acrosomas alterados. A nivel del núcleo, en la disposición de los microtúbulos y/o fibras densas, no se observaron alteraciones. Sin embargo, algunas células espermáticas sí mostraron una disposición anormal de las mitocondrias en la pieza intermedia, aunque el porcentaje de células con este tipo de alteración no fue significativo.

Fragmentación del ácido desoxirribonucleico

Con el fin de comprobar a nivel molecular si la inmovilización provoca la fragmentación del ADN, empleamos la técnica TUNEL. Observamos que en el caso de los normozoospermicos, el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado fue del 2,3% en el grupo control y del 1,2% en el grupo de espermatozoides inmovilizados. Al realizar el análisis estadístico, no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, en los sujetos teratozoospermicos el grupo control mostró un porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN significativamente superior al observado en el grupo de espermatozoides inmovilizados (5,9 y 1%, respectivamente; $p=0,008$) ([tabla 1](#)).

Valoración del estado del acrosoma

En cuanto al acrosoma, en los sujetos con teratozoospermia se observan diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides que habían sufrido reacción acrosómica entre el grupo control (2,4%) y el grupo de espermatozoides inmovilizados (69,7%). En estudios previos de nuestro grupo¹⁷, encontramos diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de espermatozoides inmovilizados en sujetos normozoospermicos (24% y 95,5%, respectivamente) ([tabla 1](#)).

Discusión

La inmovilización espermática previa a la ICSI es necesaria para poder incrementar, de forma significativa, el porcentaje de fecundación^{9,13,22,23}. Es importante conocer si los daños producidos tras la inmovilización espermática son más acusados en aquellas muestras que presenten alguna alteración citomorfológica, ya que actualmente este procedimiento se realiza utilizando la misma metodología en todos los casos. Entre las diferentes afecciones espermáticas, decidimos incluir en este estudio las muestras teratozoospermicas, ya que parecen ser las muestras patológicas más vulnerables^{22,24}. Estudios anteriores han mostrado que la inmovilización espermática puede causar alteraciones en las células espermáticas a nivel de la membrana plasmática, citoesqueleto y acrosoma en muestras normozoospermicas^{18,25}. En nuestro trabajo se comparan de forma novedosa las alteraciones a nivel ultraestructural que puede provocar la inmovilización previa a la ICSI en sujetos teratozoospermicas frente a normozoospermicos, concluyendo que los daños son similares en ambos grupos. Otra de las ventajas que ponemos de manifiesto es el poder

Tabla 1 Medias del porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ácido desoxirribonucleico y espermatozoides reaccionados en sujetos normozoospermicos y teratozoospermicos

Diagnóstico	Parámetro	Grupo control	Grupo inmovilizado	p
Normozoospermia	Porcentaje de reaccionados	24	95,5	p < 0,001
	Porcentaje de fragmentación de ADN	2,3	1,2	p = 0,075
Teratozoospermia	Porcentaje de reaccionados	2,4	69,7	p < 0,001
	Porcentaje de fragmentación de ADN	5,9	1	p = 0,008

utilizar la MET con un número relativamente bajo de células y empleando el espacio perivitelino de los ovocitos como receptáculos.

Del estudio mediante microscopía electrónica podemos concluir que uno de los orgánulos más afectados es el acrosoma. La mayoría de las células espermáticas a las que hemos sometido a inmovilización presentan el acrosoma alterado, lo cual se correlaciona perfectamente con los datos obtenidos de reacción acrosómica mediante el uso de la lectina PSA-FITC. Estos resultados confirman que la inmovilización induce la reacción acrosómica en los gametos de los sujetos teratozoospermicos, pero si comparamos los resultados con los obtenidos por nuestro grupo en trabajos previos¹⁸, podemos ver que en el caso de los sujetos normozoospermicos, la inmovilización induce la reacción acrosómica en un porcentaje mayor de células. Esto concuerda con resultados de otros autores, que encontraron una disminución del porcentaje de espermatozoides reaccionados, en presencia de zonas pelúcidas solubilizadas, al comparar sujetos normozoospermicos y con teratozoospermia severa²⁶.

A nivel ultraestructural, observamos que el proceso de inmovilización realizado previamente a la ICSI no parece inducir alteraciones a nivel del núcleo espermático, en ninguna de las muestras analizadas. Sin embargo, mediante la técnica TUNEL observamos que el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado es mayor en el grupo control que en el grupo de inmovilizados, tanto en sujetos normozoospermicos como teratozoospermicos, siendo estas diferencias significativas en los sujetos con alteración de la morfología. Nuestros resultados del grupo control están en concordancia con los porcentajes mostrados previamente en otros estudios²⁷⁻³⁰. En uno de estos trabajos²⁷, los autores encontraron valores de fragmentación de ADN por debajo del 4% en la mayoría de las muestras analizadas, tras la capacitación espermática. Aunque es conocido que el Swim-up selecciona los espermatozoides con mejor motilidad, morfológicamente normales y con menos daños a nivel del ADN³¹⁻³³, en el caso de las muestras teratozoospermicas, esta selección espermática puede ser menos eficaz, y por ello nosotros encontramos en estos casos diferencias significativas entre los espermatozoides del grupo control y los manipulados, ya que en estos últimos hemos realizado una segunda selección morfológica, por parte del micromanipulador, antes de realizar la inmovilización.

Conclusiones

Por lo tanto, y coincidiendo con otros autores³⁴, podemos afirmar que el proceso de inmovilización espermática previa a la ICSI, tanto en sujetos con parámetros seminales

normales como en aquellos con alteración de la morfología espermática, no provoca fragmentación del ADN. Estos hallazgos reafirman que la cromatina espermática está altamente compactada gracias a la sustitución de las histonas por las protaminas y al incremento de los enlaces disulfuro, durante la espermiogénesis³⁵.

Sin embargo, la inmovilización tanto en el grupo de los sujetos normozoospermicos como teratozoospermicos provoca una inducción mecánica de la reacción acrosómica y, por lo tanto, rotura de la membrana plasmática y acrosomal externa. Pudiendo este hecho favorecer la salida de factor(es) citosólico(s) del espermatozoide encargados de activar al ovocito³⁶. Nuestros resultados por tanto revelan que los daños provocados por la inmovilización son independientes de las características seminales y además reafirman el éxito de la técnica ICSI en reproducción asistida.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

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

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto de Investigación Emergente de la Universidad de Alicante (GRE08-P08) y el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Alicante (VIGROB-137).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. López V. La fertilidad en España. Análisis de la evolución de los indicadores demográficos recogidos en España. En: Matorras R,

- editor. La infertilidad en España: situación actual y perspectivas. Madrid: Imago Concept & Image Development; 2013.
- Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update*. 2002;8:183–98.
 - Palermo G, Joris H, Devroey P, van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992;340:17–8.
 - Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1993;8:1061–6.
 - Sandin S, Nygren KG, Iliadou A, Hultman CM, Reichenberg A. Autism and mental retardation among offspring born after in vitro fertilization. *JAMA*. 2013;310:75–84.
 - Jain T, Gupta RS. Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection in the United States. *N Engl J Med*. 2007;357:251–7.
 - Orozco I, Segura A, Prados F, Buxaderas R, Hernández J, Marqueta J, et al. Evolution of *in vitro* fertilization in Spain: 1993–2010. *Rev Int Androl*. 2013;11:48–53.
 - Svalander P, Forsberg AS, Jakobsson AH, Wikland M. Factors of importance for the establishment of a successful program of intracytoplasmic sperm injection treatment for male infertility. *Fertil Steril*. 1995;63:828–37.
 - Bertin G, Lejeune B, Nijs M, Vandamme B, Schoysman R. Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: Injection of immobilized spermatozoa alters rupture of the oolemma. *Hum Reprod*. 1996;11:540–7.
 - Dozortsev D, Rybouchkin A, de Sutter P, Dhont M. Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: A necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Hum Reprod*. 1995;10:2960–4.
 - Palermo G, Schlegel PN, Colombero LT, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilisation and pregnancy rates. *Hum Reprod*. 1996;11:1023–9.
 - Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey P, van Steirteghem A. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1993;59:826–35.
 - Mangelschots K, van Royen E, Joostens M, Eestermans W, Ryckaert G. ICSI and severe male-factor infertility: Breaking the tail prior to injection. *Hum Reprod*. 1995;10:484–6.
 - Dozortsev D, Quian C, Ermilov A, Rybouchkin A, de Sutter P, Dhont M. Sperm associated oocyte activating factor is released from the spermatozoon within 30 min after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod*. 1997;12:2792–6.
 - Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizarro D, Wagner D, Jaquenoud N, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1996;11:837–43.
 - Dozortsev D, de Sutter P, Dhont M. Behaviour of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1994;9:2139–44.
 - Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: The genetic implications for male infertility. *Hum Reprod*. 1995;10:2031–43.
 - Gómez-Torres MJ, Ten J, Girela JL, Romero J, Bernabeu R, de Juan J. Sperm immobilized before intracytoplasmic sperm injection undergo ultrastructural damage and acrosomal disruption. *Fertil Steril*. 2007;88:702–4.
 - Brassesco-Macazaga A, Rovira Fontanals S, del Río Bueno F, Cairó Doncos O, Monqaut A, Lafuente Varea R. ¿Es la inyección intracitoplásmica de espermatozoides morfológicamente seleccionados una técnica con futuro? *Rev Int Androl*. 2010;8:57–9.
 - Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med*. 2008;54:111–25.
 - Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil*. 1992;95:755–63.
 - Fishel S, Lisi F, Rinaldi L, Green S, Hunter A, Dowell K, et al. Systematic examination of immobilizing spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection in the human. *Hum Reprod*. 1995;10:497–500.
 - Van den Bergh M, Bertrand E, Biramane J, Englert Y. Importance of breaking a spermatozoon's tail before intracytoplasmic injection: A prospective randomised trial. *Hum Reprod*. 1995;10:2819–20.
 - Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: Correlation with semen parameters. *Andrologia*. 2009;41:383–6.
 - Takeuchi T, Colombero LT, Neri QV, Rosenwaks Z, Palermo GD. Does ICSI require acrosomal disruption? An structural study. *Hum Reprod*. 2004;19:114–7.
 - Bastiaan HS, Windt ML, Menkveld R, Kruger TF, Oehninger S, Franken DR. Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding and in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2003;79:49–55.
 - Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: Correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1997;56:602–7.
 - Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998;13:896–900.
 - Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al. Functional and ultrastructural features DNA-fragmented human sperm. *J Androl*. 2000;21:903–12.
 - Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long time incubation. *J Androl*. 2003;24:253–62.
 - Oehninger S, Acosta R, Morshedi M, Philput C, Swanson RJ, Acosta AA. Relationship between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up sperm fractions. *J Androl*. 1990;11:446–52.
 - Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 2001;16:1950–3.
 - Piomboni P, Bruni E, Capitani S, Gambera L, Moretti E, la Marca A, et al. Ultrastructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm. *Arch Androl*. 2006;52:51–9.
 - Xu ZP, Sun HX, Hu YL, Zhang NY, Zhao X. Lasser-assisted immobilization causes no direct damage to sperm DNA. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2007;13:216–8.
 - Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*. 1982;93:298–305.
 - Yanagida K, Katayose H, Hirata S, Yazawa H, Hayashi S, Sato A. Influence of sperm immobilization on onset of Ca²⁺ oscillations after ICSI. *Hum Reprod*. 2001;16:148–52.