

Evaluación de la fragmentación del ADN espermático luego del empleo de diferentes técnicas de selección espermática

Evaluation of sperm DNA fragmentation after using different sperm selection techniques

Cuesta Carolina^{1,2}, Estefanía Martínez¹, Antonio Cattaneo¹, Diego Gnocchi¹, Marcela Irigoyen¹, Lautaro Tessari¹, A. Gustavo Martínez^{1,2}

1 Medicina Reproductiva Fertilis - Boulogne, Buenos Aires, Argentina.

2 Universidad de Belgrano – Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

Pregunta de estudio: Qué técnica de selección espermática reducirá en mayor proporción los niveles de fragmentación del ADN espermático?

Respuesta resumida: El sistema microfluídico ZyMöt logró la mayor reducción de la fragmentación del ADN espermático comparado con Swim-up y Gradiente de densidad.

Lo que ya se sabe: Altos niveles de fragmentación del ADN espermático pueden afectar el éxito reproductivo en diversas formas: pobre calidad embrionaria, disminución de la tasa de implantación y de embarazo, aumento del tiempo de concepción entre otras.

Diseño del estudio: Dos experimentos prospectivos, con 25 y 19 pacientes respectivamente, realizado entre enero 2019 y marzo 2021.

Materiales y Métodos: En el experimento 1 se evaluó la fragmentación del ADN espermático luego del procesamiento de las muestras de semen mediante las técnicas gradiente de densidad y Swim-up. En el experimento 2 se evaluó la fragmentación

ABSTRACT

Study question: Which sperm selection technique will most significantly reduce sperm DNA fragmentation levels?

Summary answer: The ZyMöt microfluidic system achieved the greatest reduction in sperm DNA fragmentation compared to Swim-up and Density Gradient centrifugation.

What is already known: High levels of sperm DNA fragmentation can affect reproductive success in various ways: poor embryonic quality, decreased implantation and pregnancy rates and increased conception time.

Study design: Two prospective experiments, with 25 and 19 patients respectively, conducted between January 2019 and March 2021.

Materials and Methods: Sperm DNA fragmentation was evaluated in Experiment 1 after processing semen samples using Density Gradient centrifugation and Swim-up techniques and in Experiment 2 it was evaluated after processing semen samples using Swim-up techniques and the ZyMöt microfluidic system.

del ADN espermático luego del procesamiento de las muestras de semen mediante las técnicas Swim-up y del sistema microfluídico ZyMöt. Para evaluar la fragmentación del ADN espermático, se utilizó la técnica de Tunel post procesamiento. Los resultados fueron analizados mediante los test Kruskal-Wallis y Mann Whitney según correspondiera, considerando significativos los valores de $p < 0.05$.

Resultados: En el Experimento 1, la técnica Swim-up mostró una disminución significativamente mayor de la fragmentación del ADN espermático al compararla con el gradiente de densidad ($9.1\% \pm 1.9$ vs. $19.2\% \pm 5.1$). En el Experimento 2, el sistema microfluídico mostró una disminución significativamente mayor de la fragmentación del ADN espermático al compararlo con el Swim-up ($1.3\% \pm 0.7$ vs. $9.1\% \pm 2.0$).

Implicancias de los hallazgos: Es necesario evaluar la utilidad de un determinado método de selección espermática de acuerdo a la técnica de reproducción asistida donde la muestra enriquecida va a ser empleada. ZyMöt mostró ser más eficaz para reducir la fragmentación del ADN espermático.

Palabras clave: Fragmentación del ADN espermático, selección espermática, dispositivo microfluídico.

To evaluate sperm DNA fragmentation post-processing Tunel technique was used. The results were analyzed using the Kruskal-Wallis and Mann Whitney tests as appropriate, considering p values < 0.05 significant.

Results: *In Experiment 1, the Swim-up technique showed a significantly greater decrease in sperm DNA fragmentation when compared to Density Gradient centrifugation ($9.1\% \pm 1.9$ vs. $19.2\% \pm 5.1$). In Experiment 2, the microfluidic system showed a significantly greater decrease in sperm DNA fragmentation when compared to swim-up ($1.3\% \pm 0.7$ vs. $9.1\% \pm 2.0$).*

Wider implications of the findings: *It is necessary to evaluate the usefulness of a certain method of sperm selection according to the assisted reproduction technique where the enriched sample will be used. ZyMöt proved to be more effective in reducing sperm DNA fragmentation.*

Key words: *Sperm DNA Fragmentation, sperm selection, microfluidic device*

INTRODUCCIÓN

El material genético paterno compone el 50% del genoma embrionario, y contiene genes involucrados tanto en el correcto desarrollo embrionario y fetal. Los daños producidos en el ADN espermático pueden afectar el éxito reproductivo en diversas formas: pobre calidad embrionaria, disminución de las tasa de implantación y de embarazo, aumento del tiempo de concepción entre otras⁽¹⁻³⁾. Por ello, el nivel de integridad genómica se asocia a la calidad seminal, de hecho se ha comprobado en una alta proporción de hombres infértiles un aumento de la fragmentación del ADN espermático, determinando a este parámetro seminal en particular como la causa principal de infertilidad masculina a nivel molecular⁽⁴⁾. Dicho factor masculino es de origen multicausal, siendo el principal contribuyente el estrés oxidativo, producido por un desbalance entre las especies reactivas a oxígeno y las especies antioxidantes^(5,6).

Cuando el hombre realiza un tratamiento de fertilidad, una de las causas de estrés oxidativo adicional, está ligada a las técnicas rutinarias de selección espermática: Swim-up o gradiente de densidad, debido a que incluyen pasos de centrifugación que someten al gameto masculino a estrés fisiológico y genera sobreproducción de especies reactivas de oxígeno en ésta⁽⁷⁾.

Ante estos hallazgos, el enfoque actual en el desarrollo de nuevas técnicas de selección espermática es preservar la integridad del ADN con objetivo de conseguir un recién nacido vivo sano. Entre las técnicas de vanguardia se destacan los dispositivos microfluídicos, los cuales han estado en auge durante la última década por su alta eficiencia⁽⁸⁾. Esta novedosa tecnología posee la propiedad de manipular pequeños volúmenes de muestras biológicas a micro

escala que, aplicada a la andrología, permite imitar en tres dimensiones el entorno biofísico al que están expuestos los espermatozoides en el proceso de selección in vivo^(9,10). Los sistemas disponibles se presentan en forma de chips, los cuales están demostrando su capacidad de mejorar de manera efectiva y consistente los parámetros clave de las muestras de semen como el recuento, la motilidad y la morfología espermática, así como también, una mayor integridad del ADN al prescindir de la centrifugación^(11,12). Cabe destacar que esta metodología utiliza muestras en fresco y sólo requiere de medio para recuperar la muestra procesada. Todas estas facultades posicionan a los chips microfluídicos como potenciales candidatos a utilizarse en las clínicas de fertilidad.

El presente estudio fue realizado como parte de la implementación de una técnica para disminuir la fragmentación del ADN espermático en muestras con altos niveles del mismo. Por ello, el objetivo del mismo fue comparar el efecto de tres técnicas de selección de espermatozoides sobre este parámetro seminal.

DISCUSIÓN

Diseño: Estudio prospectivo llevado a cabo en Medicina Reproductiva Fertilis entre enero de 2019 y marzo de 2021.

Se emplearon muestras de semen de varones diagnosticados normozoospermicos, según los parámetros estandarizados publicados en el manual de la OMS 2010⁽¹³⁾. Además de los pacientes que no cumplían con este requisito también fueron excluidas las muestras de aquellos pacientes con azoospermia, criptoospermia, eyaculación retrógrada, leucocitospermia y los que habían sido expuestos a quimioterapia, radioterapia o pesticidas u otros tóxicos y también los pacientes con una historia de

infección o fiebre en los 3 meses previos al tratamiento. Las comparaciones se realizaron en dos experimentos.

Experimento 1: Comparación de los niveles de fragmentación del ADN espermático luego del procesamiento de las muestras de semen mediante gradiente de densidad y Swim-up

Se emplearon 25 muestras de semen de pacientes con indicación de espermograma completo y análisis de fragmentación del ADN espermático. Las edades de dichos pacientes osciló entre los 30 y 39 años (edad promedio: 34.3 ± 2.4). Los pacientes firmaron el consentimiento de investigación correspondiente.

Luego de registrar los parámetros seminales básicos de la muestra en fresco: volumen, concentración y movilidad, cada muestra fue dividida en dos fracciones tratando cada una ya sea mediante un gradiente de densidad o mediante un Swim-up. Luego de procesadas las muestras se registró el volumen, la concentración y la movilidad, junto con el nivel de fragmentación del ADN espermático. Finalmente se procedió a comparar la fragmentación del ADN luego del procesamiento de las muestras con ambas metodologías.

Experimento 2: Comparación de los niveles de fragmentación del ADN espermático luego del procesamiento de las muestras de semen mediante Swim-up y un sistema microfluídico (ZyMöt)

Se emplearon 19 muestras de semen entregadas para realizar fecundación in-vitro obtenidas de pacientes que habían realizado espermogramas previos en los cuales se había determinado niveles de fragmentación del ADN espermático $>20\%$ luego del procesamiento por gradiente de densidad. El promedio del nivel de fragmenta-

ción espermática fue 25.8 ± 2.6 . Las edades oscilaron entre los 32 y 38 años (edad promedio 34.4 ± 1.9). Los pacientes firmaron el consentimiento de investigación correspondiente.

Luego de registrar los parámetros seminales básicos de la muestra en fresco: volumen, concentración y movilidad, se tomaron dos fracciones de 0.85 ml de cada muestra, las cuales fueron tratadas ya sea mediante un Swim-up o con un sistema microfluídico (ZyMöt, EEUU). Luego de procesadas las muestras se registró el volumen, la concentración y la movilidad, junto con el nivel de fragmentación del ADN espermático. Finalmente se procedió a comparar la fragmentación del ADN luego del procesamiento de las muestras con ambas metodologías.

Técnicas de procesamiento de las muestras de semen

Gradiente de densidad: luego de evaluados el volumen, la concentración y la movilidad de la muestra de semen, esta fue sembrada sobre un gradiente de dos capas de diferente concentración (50% y 90%) de PureCeption (SAGE, EEUU) en un tubo de centrifuga de 15 ml (Nunc, Dinamarca). El sistema fue centrifugado durante 20 minutos a 300g. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en medio HTF modificado (SAGE, EEUU) suplementado con 3% de albúmina (SAGE, EEUU). Luego de ello se realizó una nueva centrifugación de 10 min a 300g y se descartó el sobrenadante. Finalmente, el precipitado fue diluido en medio HTF modificado suplementado con 3% de albúmina, llevando el volumen final a 0.4 ml. Se evaluó la concentración y la movilidad empleando una cámara de Makler.

Técnica de Swim-up: luego de evaluar el

volumen, la concentración y la movilidad de la muestra de semen, esta fue colocada en un tubo de centrifuga de 15 ml, colocando sobre ella 2 ml de medio HTF modificado suplementado con 3% de albúmina. Luego de ello, el tubo fue incubado durante una hora a 37°C en un cubo térmico. Posteriormente, se tomó el sobrenadante y se lo depositó en un nuevo tubo de centrifuga de 15 ml, el cual fue centrifugado durante 5 min a 300g. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue diluido en medio HTF modificado suplementado con 3% de albúmina, llevando el volumen final a 0.4 ml o 0.85 ml según el experimento. Se evaluó la concentración y la movilidad empleando una cámara de Makler.

Técnica de dispositivo microfluídico (ZyMöt): luego de evaluar el volumen, la concentración y la movilidad de la muestra de semen, esta fue colocada en un chip ZyMöt (Figura 1). En primer lugar, se cargaron 0.85 ml de la muestra en fresco en el orificio de carga, llenando de esta forma el compartimento inferior. A continuación, se agregaron 2 ml medio HTF modificado suplementado con 3% de albúmina en el compartimento superior del sistema.



Figura 1. Dispositivo microfluídico ZyMöt

El dispositivo fue incubado durante 30 min en cámara húmeda a 37°C, luego de lo cual se recolectaron 0.85 ml de la solución resultante en la cámara superior, los cuales fueron colocados en un tubo de centrifuga de 15 ml. Se evaluó la concentración y la movilidad empleando una cámara de Makler.

Evaluación del grado de fragmentación del ADN espermático

Una vez procesadas las muestras por gradiente de densidad, Swim-up o ZyMöt, se tomaron 100 μ l de las mismas para fijarlos agregando 5 μ l de Formaldehído al 37% para el futuro procesamiento por TUNEL. Dichas muestras fueron colocadas en heladera hasta el momento de uso.

Para realizar la técnica de TUNEL, se emplearon portaobjetos con pocillos, los cuales fueron sumergidos por al menos 2 horas en Polilisina 0.1% y enjuagados con agua ultra pura. Luego del secado a temperatura ambiente se retiraron de la heladera las muestras fijadas con Formaldehído al 37% y se sembraron 30 μ l de cada una de ellas en sus correspondientes pocillos por duplicado. Los portaobjetos se guardaron dentro de una cámara húmeda conformada por una placa de Petri y papel tissue húmedo en su interior a 37°C por 1 hora. Se dejaron reposar en heladera por 24 horas. Luego de ello, las muestras fueron lavadas tres veces con 10 μ l de PBS 1x, cada una durante 5 min. Luego se agregó Metanol por 90 segundos y se repitieron los 3 lavados con PBS 1x. Se colocaron 10 μ l de solución de bloqueo PBS+0.5%BSA dejándola por 50 min dentro de la cámara húmeda en la heladera y una vez concluido ese tiempo, se realizaron otros 3 lavados con PBS 1x. Protegidos de la luz, a cada pocillo se le añadió una mezcla de 4.5 μ l de label y 3.5 μ l de enzima y los

portaobjetos se dejaron dentro de la cámara húmeda por una hora sobre una platina térmica a 37°C. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con 10 µl de PBS 1x y se dejó secar por completo a temperatura ambiente, siempre evitando la exposición a luz. Por último, se agregaron 5 µl de agente de montaje Vecta-Shield a cada pocillo y por encima se colocó un cubreobjetos de 24x50 mm.

Finalmente, se observó en el microscopio de fluorescencia a un aumento de 100X bajo aceite de inmersión. En cada ensayo se analizaron 200 espermatozoides. Los espermatozoides que presentaron ADN fragmentado mostraron fluorescencia verde. Se consideró con marcación positiva a aquellos espermatozoides con fluorescencia en al menos el 50% del citoplasma, mientras que el resto de las células fueron consideradas negativas. Se registró el número de espermatozoides por marcación positiva sobre los espermatozoides totales.

Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados empleando el Mann Whitney Test en el Experimento 1 y el Kruskal-Wallis Test en el Experimento 2, utilizando el programa Instat versión 7 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Experimento 1: Comparación de los niveles de fragmentación del ADN espermático luego del procesamiento de las muestras de semen mediante gradiente de densidad y Swim-up

En la tabla 1 se detallan los valores promedio de los parámetros seminales de las 25 muestras de semen procesadas en el Experimento 1.

Al comparar los resultados obtenidos luego del procesamiento de la muestra mediante gradiente de densidad y Swim-up se observó que la fracción de la muestra procesada por gradiente de densidad tuvo significativamente una mayor concentración espermática y un mayor número de espermatozoides progresivos totales; mientras que, la fracción procesada por Swim-up mostró significativamente una mayor porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y menor porcentaje de fragmentación del ADN espermático (Tabla 2).

Experimento 2: Comparación de los niveles de fragmentación del ADN espermático luego del procesamiento de las muestras de semen mediante Swim-up y un sistema microfluídico (ZyMöt)

En la tabla 3 se detallan los valores promedio de las 19 muestras de semen procesadas en el Experimento 2.

Tabla 1. Parámetros seminales iniciales de las muestras empleadas en el Experimento 1

Parámetros seminales	
Volumen (ml)	2.9 ± 0.7
Concentración espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/ml)	63.0 ± 21.6
Espermatozoides totales ($\times 10^6$)	182.3 ± 75.4
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	48.3 ± 9.4
Espermatozoides con movilidad in situ (%)	2.6 ± 0.2
Espermatozoides inmóviles (%)	49.2 ± 9.4

Al comparar los resultados obtenidos luego del procesamiento de la muestra mediante Swim-up y ZyMöt, se observó que la fracción de la muestra procesada por Swim-up tuvo significativamente una mayor concentración espermática y un mayor número de espermatozoides progresivos totales; mientras que, la fracción procesada por ZyMöt mostró significativamente un mayor porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y menor porcentaje de fragmentación de ADN espermático (Tabla 4).

DISCUSIÓN

Como resultado de la primera parte del presente trabajo hemos encontrado que pese a que, con el gradiente de densidad

se obtiene una mayor concentración de espermatozoides y un mayor número de espermatozoides progresivos totales, la fracción de la muestra procesada mediante Swim-up mostró un nivel de fragmentación del ADN espermático significativamente menor. La posible explicación de este hallazgo es la diferencia en el tiempo de centrifugación en cada uno de los métodos de selección. En el gradiente de densidad se realizan dos centrifugaciones, la primera de 20 minutos para realizar la selección espermática y la segunda de 10 minutos para lavar la muestra. En contraste, en el Swim-up se realiza una primera selección pasiva basada sólo en la capacidad que poseen los espermatozoides de

Tabla 2. Comparación de los parámetros seminales de las muestras luego de procesamiento mediante gradiente de densidad y Swim-up

Parámetros seminales	Gradiente	Swim-up
Concentración espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/ml)	62.8 \pm 23.2 a	32.4 \pm 8.3 b
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	95.0 \pm 4.1 a	98.4 \pm 2.4 b
Espermatozoides progresivos totales ($\times 10^6$)	24.0 \pm 9.3 a	12.6 \pm 3.3 b
Fragmentación del ADN espermático (%)	19.2 \pm 5.1 a	9.1 \pm 1.9 b

Tabla 3. Parámetros seminales iniciales de las muestras empleadas en el Experimento 2

Parámetros seminales	
Volumen (ml)	2.8 \pm 0.5
Concentración espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/ml)	105.7 \pm 24.8
Espermatozoides totales ($\times 10^6$)	297.2 \pm 89.0
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	37.5 \pm 10.5
Espermatozoides con movilidad in situ (%)	1.3 \pm 0.6
Espermatozoides inmóviles (%)	61.2 \pm 10.5

Tabla 4. Comparación de los parámetros seminales de las muestras luego de procesamiento mediante Swim-up y ZyMöt

Parámetros seminales	Gradiente	Swim-up
Concentración espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/ml)	19.6 \pm 11.1 a	10.4 \pm 6.6 b
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	97.9 \pm 2.5 a	99.7 \pm 1.2 b
Espermatozoides progresivos totales ($\times 10^6$)	13.4 \pm 3.5 a	8.9 \pm 5.6 b
Fragmentación del ADN espermático (%)	9.1 \pm 2.0 a	1.3 \pm 0.7 b

nadar hacia el medio de cultivo dejando atrás a aquellos que no pueden moverse o se mueven poco, para finalmente realizar la concentración de la muestra obtenida mediante una centrifugación de 5 minutos. Han sido demostrado los efectos que producen los pasos de centrifugación al someter al gameto masculino a un estrés fisiológico y generar sobreproducción de especies reactivas de oxígeno en la muestra procesada⁽⁷⁾, trayendo por consiguiente alteraciones seminales, entre ellas, mencionado el daño del ADN espermático.

A la luz de estos resultados sería recomendable la elección de la técnica de Swim-up para procesar las muestras de semen para un tratamiento de reproducción asistida. Pese a ello, esta técnica tiene algunas limitaciones tales como la dificultad para procesar muestras con alta viscosidad, o la baja recuperación en las muestras con muy baja densidad de espermatozoides (oligozoospermias). Teniendo en cuenta lo mencionado, se debe evaluar la conveniencia de usar una u otra técnica dependiendo del uso posterior de la muestra procesada. Mientras que para una inseminación artificial se necesita obtener una gran cantidad de espermatozoides aceptando que el porcentaje de móviles progresivos sea algo menor al 100%⁽¹⁴⁾, para utilizar la muestra en una fecundación in vitro convencional será preferible tener un alto porcentaje de espermatozoides móviles progresivos (idealmente el 100%) pese a contar con menor cantidad de espermatozoides totales. El hecho de que con el Swim-up se obtengan muestras con menores niveles de fragmentación del ADN luego de ser procesadas agrega una gran ventaja a este método para ser usado en fecundación in vitro convencional. En el caso de la inseminación intrauterina es esperable que el aparato reproductor

femenino seleccione el espermatozoide óptimo.

En la comparación de las técnicas de Swim-up y el sistema microfluídico ZyMöt, ambos mostraron buenos resultados, de modo que, las dos metodologías de selección son aceptables para su utilización en tratamientos de fecundación in vitro. Pero en el caso de ZyMöt, este mostró una mayor capacidad de disminución del nivel de fragmentación del ADN espermático (cercano a 0%), lo cual le confiere una ventaja mayor para ser aplicado en tratamientos de fertilización in vitro. Este sistema, basado en el Swim-up, no solo evita la centrifugación, también limita el ascenso de determinados espermatozoides por la presencia de una membrana micro porosa. Esta actúa como una barrera que impide el pasaje de espermatozoides con morfología y motilidad alteradas, los cuales se pueden correlacionar con lesiones en su ADN. De allí otra razón por la que este tipo de dispositivo permite recuperar espermatozoides con mayor integridad genómica⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Una limitación del Experimento 2 es el hecho de no saber si el día en que las muestras fueron empleadas para realizar fecundación in vitro el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN espermático era de igual valor al diagnosticado en el espermograma. Pese a ello, el análisis de los valores de Tunel obtenidos muestran que, cualquiera sea la técnica empleada, los resultados con el uso de ZyMöt son los más aceptables.

Es importante destacar que la técnica del sistema microfluídico tiene algunas limitaciones tales como la dificultad en el uso de muestras con alta viscosidad, o muestras con presencia de burbujas, y muestras con oligozoospermia severa.

Cabe mencionar también que, al tratarse

de un laboratorio nuevo, el mismo no contaba con una herramienta para llevar a cabo el presente estudio, por lo que entre las diferentes opciones, se evaluó adquirir columnas de Anexina-V para su realización. Finalmente esta opción fue descartada debido a su alto costo de implementación, el relativo corto vencimiento de las columnas y el hecho de no contar con datos concluyentes sobre los efectos del campo magnético en los espermatozoides sometidos a este proceso de selección⁽¹⁸⁾.

En conclusión, a partir de nuestros resultados podemos afirmar que es necesario evaluar la utilidad de un determinado método de selección espermática de acuerdo

a la técnica de reproducción asistida donde la muestra enriquecida va a ser empleada. En cuanto a la eficacia de las metodologías estudiadas, la técnica de Swim-up mostró resultados positivos en cuanto a la recuperación espermática y su nivel de fragmentación genómica. Sin embargo, el sistema microfluídico mostró ser la técnica más eficaz, ya que logra proveer muestras prácticamente libres de espermatozoides con su ADN fragmentado. A pesar de los resultados alentadores, aún se requiere de más estudios que esclarezcan fehacientemente el proceso por el cual el sistema microfluídico logra reducir dichos niveles de fragmentación.

REFERENCIAS

1. Agarwal A, Majzoub A, Baskaran S, PannerSelvam M K, Cho CL, Henkel R, Finelli R, Leisegang K, Sengupta P, Barbarosie C, ParekhN, Alves MG, Ko E, Arafa M, Tadros N, Ramasamy R, Kavoussi P, Ambar R, Kuchakulla M, Robert KA, Shah R. Sperm DNA fragmentation: A new guideline for clinicians. *The World Journal of Men's Health*. 2020; 38:412–471.
2. Martínez E, Bezazián C, Bezazián A, LindlK, Peliquero A, Cattaneo A, Gnocchi D, Irigoyen M, Tessari L, Martínez AG. Sperm DNA fragmentation and male age: results of in vitro fertilization treatments. *JBRA Assist Reprod*. 2020; Nov 5. doi: 10.5935/1518-0557.20210018. Epub ahead of print. PMID: 34061484.
3. Ribas-Maynou J, Yeste M, Salas-Huetos A. The relationship between sperm oxidative stress alterations and IVF/ICSI outcomes: A systematic review from nonhuman mammals. *Biology*. 2020; 9:178.
4. Agarwal A, PannerSelvam MK, Baskaran S, Cho CL. Sperm DNA damage and its impact on male reproductive health: a critical review for clinicians, reproductive professionals and researchers. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2019; 19:443–457.
5. Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction*. 2020; 159:189–201.
6. Chianese R, Pierantoni R. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production alters sperm quality. *Antioxidants*. 2021; 10:92.
7. Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat MS, Shafiee H, Anchan RM, Mutter GL, Tüzel E, Demirci U. Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Advanced Healthcare Materials*. 2014; 3:1671–1679.
8. Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC, Anchan RM, Mutter GL, Asghar W. Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Bio-technology Advances*. 2016; 34:578–587.
9. Sequeira RC, Criswell T, Atala A, Yoo JJ. Microfluidic systems for assisted reproductive technologies: advantages and potential applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2020; 17:787–800.
10. Vaughan DA, Sakkas D. Sperm selection methods in the 21st century. *Biology of Reproduction*, 2019; 101:1076–1082.
11. Gode F, Gürbüz AS, Tamer B, Pala I, Isik AZ. The effects of microfluidic sperm sorting, density gradient and swim-up methods on semen oxidation reduction potential. *Urology Journal*. 2020; 17:397–401.
12. Parrella A, Keating D, Cheung S, Xie P, Stewart JD, Rosenwaks Z, Palermo GD. A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2019; 36:2057–2066.
13. WHO World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edn. Geneva: World Health Organization. 2010.
14. Muthigi A, Jahandideh S, Bishop LA, Naeemi FK, Shipley SK, O'Brien JE, Shin PR, Devine K, Tanrikut C. Clarifying the relationship between total motile sperm counts and intrauterine insemination pregnancy rates. *Fertility and Sterility*. 2021; 115:1454–1460.
15. Nosrati R, Graham PJ, Zhang B, Riordon J, Lagunov A, Hannam TG, Escobedo C, Jarvi K, Sinton D. Microfluidics for sperm analysis and selection. *Nature Reviews. Urology*. 2017; 14:707–730.
16. Samuel R, Feng H, Jafek A, Despain D, Jenkins T, Gale B. Microfluidic-based sperm sorting analysis for treatment of male infertility. *Translational Andrology and Urology*.

2018; 7:336-347.

17. Shirota K, Yotsumoto F, Itoh H, Obama H, Hidaka N, Nakajima K, Miyamoto S. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertility and Sterility*. 2016; 105:315–21.e1.
18. De Gheselle S, Deroose A, Stevens J, Hiel M, Tilleman K. A methodological validation of an easy one-step swimout semen preparation procedure for selecting DNA fragmentation-free spermatozoa for ICSI. *Andrologia*. 2020; 52:e13852.