

Evaluación comparativa de la selección espermática en semen humano mediante dispositivos microfluídicos ZyMōt y plataformas basadas en reotaxis

Marta Gargallo-Alonso¹, Luis Serrano², Sofía Sanchez³, Laura Díaz³, Pablo Martínez Vicente⁴, Clara Malo^{1,5,6}

¹ Tissue Microenvironment (TME) Lab, Aragón Engineering Research Institute (I3A), University of Zaragoza, Mariano Esquillor s/n, 50018, Zaragoza, Spain

e-mail: mgargallo@unizar.es

² Agrofluidics, CEMINEM, Campus Río Ebro, Calle Mariano Esquillor, s/n, 50018 Zaragoza, España

³ Grupo Internacional UR Zaragoza, Clínica HLA Montpellier, Via Hispanidad 37, 50012 Zaragoza, España

⁴ Edificio CIRCE, Calle Mariano Esquillor 15, 50018 Zaragoza, España

⁵ Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, Avda de San Juan Bosco, 13, 50009, Zaragoza, España

⁶ Área de Reproducción y Obstetricia, Departamento de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, 50013, Zaragoza, España

Resumen

Se comparó la selección espermática mediante ZyMōt y una plataforma microfluídica basada en reotaxis en semen humano fresco. ZyMōt preservó mejor la motilidad y la integridad acrosomal, mientras que la reotaxis mostró enriquecimiento celular, pero también signos de daño espermático, lo que indica la necesidad de optimizar sus condiciones hidrodinámicas.

Introducción

La selección espermática es un paso clave en las técnicas de reproducción asistida (TRA), ya que la calidad de los espermatozoides seleccionados influye directamente en la fecundación, el desarrollo embrionario y los resultados clínicos. Los métodos convencionales de selección, como el swim-up o los gradientes de densidad, pueden inducir estrés oxidativo y daño en el ADN espermático debido a los procesos de centrifugación [1].

En este contexto, las tecnologías microfluídicas biomiméticas han surgido como una alternativa menos invasiva y más cercana a los mecanismos fisiológicos del tracto reproductor femenino. El dispositivo ZyMōt ha demostrado seleccionar espermatozoides humanos con menor fragmentación del ADN y mayor motilidad progresiva que los métodos convencionales [1]. Asimismo, las plataformas basadas en reotaxis aprovechan la capacidad espermática de orientarse frente a un flujo, descrita en humanos y relacionada con su navegación fisiológica [2,3]. No obstante, su optimización hidrodinámica para la aplicación clínica sigue siendo limitada [3].

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de la selección espermática mediante el dispositivo microfluídico ZyMōt y una plataforma basada en reotaxis sobre distintos parámetros de calidad espermática en muestras frescas de semen humano.

Material y métodos

Se utilizaron muestras frescas de eyaculado humano procedentes de pacientes de la clínica de fertilidad UR Montpellier, Zaragoza. Tras el espermiograma inicial, las muestras se distribuyeron en tres grupos: control, sin selección espermática; ZyMōt, procesado mediante el dispositivo microfluídico ZyMōt; y reotaxis, seleccionado mediante una plataforma microfluídica basada en el movimiento espermático contra flujo.

En la plataforma de reotaxis se emplearon condiciones previamente optimizadas en espermatozoides porcinos, concretamente un flujo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Tras cada tratamiento, las muestras fueron reevaluadas para comparar los efectos de los procedimientos de selección.

La valoración espermática incluyó motilidad y parámetros cinéticos mediante sistema CASA, así como análisis por citometría de flujo de viabilidad celular con Calceína, integridad acrosomal mediante FITC-PNA y fluidez de membrana mediante Merocianina 540. La fragmentación del ADN se evaluó mediante Halo test y la morfología según criterios estrictos. Se contaron un total de 30000 espermatozoides por muestra.

Resultados y discusión

La selección mediante reotaxis produjo una marcada reducción de la concentración espermática final respecto al control, evidenciando su capacidad para enriquecer una subpoblación específica de espermatozoides con respuesta al flujo aplicado. Sin embargo, las muestras procesadas por reotaxis mostraron menores valores de motilidad total y progresiva, mientras que ZyMöt presentó los valores más altos, sugiriendo una mejor preservación funcional tras la selección.

En los parámetros cinéticos no se observaron diferencias significativas para VCL, VSL, VAP, STR ni ALH. No obstante, la linealidad fue mayor en el control que en reotaxis, con valores intermedios en ZyMöt; WOB fue superior en el control, y BCF fue mayor en ZyMöt. Los valores de motilidad del grupo reotaxis fueron inferiores tras la recuperación de la muestra, pese a observarse mayores valores dentro del chip, posiblemente debido a presiones o alteraciones durante el proceso de recuperación, se ajustará el procedimiento en futuras optimizaciones para preservar mejor la funcionalidad espermática.

El análisis de fragmentación del ADN mostró valores superiores en reotaxis respecto a ZyMöt, mientras que el control presentó valores intermedios. En cuanto a la funcionalidad de membrana, reotaxis mostró mayor proporción de espermatozoides muertos con fluidez de membrana y menor proporción de vivos sin fluidez, sugiriendo desestabilización de membrana y cambios compatibles con capacitación temprana.

Respecto a la integridad acrosomal, control y reotaxis mostraron resultados similares, mientras que ZyMöt presentó mayor proporción de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro.

Conclusiones

La selección basada en reotaxis permitió enriquecer subpoblaciones espermáticas específicas; sin embargo, el protocolo utilizado se asoció con una menor motilidad y una mayor fragmentación del ADN, lo que sugiere posibles alteraciones durante el procesamiento.

Las condiciones de flujo previamente optimizadas para semen porcino podrían no ser directamente extrapolables a semen humano, ya que podrían generar estrés mecánico o alteraciones de membrana que limiten la funcionalidad espermática. En contraste, ZyMöt mostró una mejor preservación de

la motilidad, la integridad acrosomal y la calidad espermática global.

Estos resultados sugieren que la reotaxis representa una estrategia fisiológica prometedora para la selección espermática, aunque requiere una optimización específica de las condiciones hidrodinámicas y de los tiempos de procesamiento antes de su aplicación clínica en semen humano.

Referencias

- [1]. PARDIÑAS GARCIA, M.L., DE LOS SANTOS, J.M., MARTIN, A., et al. Microfluidic-based device selects sperm with less DNA damage and higher motility, what else? Human Reproduction. 2022, 37(Supplement 1), deac107.078.
- [2]. ZAFERANI, M., CHEONG, S.H., ABBAS, A., et al. Rheotaxis-based separation of sperm with progressive motility using a microfluidic corral system. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018, 115(33), 8272-8277.
- [3]. SARBANDI, I.R., LESANI, A., ZAND, M.M., et al. Rheotaxis-based sperm separation using a biomimicry microfluidic device. Scientific Reports. 2021, 11, 18327.

Tabla 1. Resultados citometría de flujo y fragmentación del ADN espermático. Datos expresados como media $\pm$ desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos; letras compartidas indican ausencia de diferencias significativas según ANOVA y Tukey, $p < 0,05$.

Variable	CONTROL	REOTAXIS	ZYMOT	P-value
ADN fragmentación	42,86 $\pm$ 16,29 ^a	57,57 $\pm$ 16,36 ^a	14,17 $\pm$ 9,28 ^b	<0,001
Muerto sin fluidez de membrana	8,55 $\pm$ 5,57 ^{ab}	13,57 $\pm$ 5,60 ^a	4,33 $\pm$ 1,76 ^b	0,010
Muerto con fluidez de membrana	28,71 $\pm$ 9,86 ^a	32,24 $\pm$ 11,49 ^a	6,73 $\pm$ 4,28 ^b	<0,001
Vivo sin fluidez de membrana	58,76 $\pm$ 9,16 ^a	49,59 $\pm$ 16,51 ^a	87,70 $\pm$ 4,86 ^b	<0,001
Vivo con fluidez de membrana	3,98 $\pm$ 0,92 ^a	4,60 $\pm$ 1,39 ^a	1,22 $\pm$ 0,67 ^b	<0,001
Vivo acrosoma íntegro	67,59 $\pm$ 6,32 ^a	64,56 $\pm$ 5,96 ^a	89,29 $\pm$ 3,85 ^b	<0,001
Vivo acrosoma dañado	4,65 $\pm$ 1,39 ^a	6,69 $\pm$ 2,39 ^a	1,71 $\pm$ 0,85 ^b	<0,001
Muerto acrosoma íntegro	10,34 $\pm$ 2,27 ^a	8,40 $\pm$ 2,51 ^a	4,01 $\pm$ 1,53 ^b	<0,001
Muerto acrosoma dañado	17,41 $\pm$ 4,58 ^a	20,35 $\pm$ 4,90 ^a	4,98 $\pm$ 2,76 ^b	<0,001

Tabla 2. Resultados motilidad y cinética espermática. Datos expresados como media $\pm$ desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos; letras compartidas indican ausencia de diferencias significativas según ANOVA y Tukey, $p < 0,05$.

Variable	CONTROL	REOTAXIS	ZYMOT	P-value
MT	44,43 $\pm$ 25,08 ^{ab}	22,86 $\pm$ 11,46 ^a	58,00 $\pm$ 17,43 ^b	0,038
MP	25,86 $\pm$ 22,15 ^a	8,00 $\pm$ 6,33 ^a	31,00 $\pm$ 10,15 ^a	0,067
Conc	25,14 $\pm$ 14,02 ^a	2,77 $\pm$ 2,87 ^b	6,67 $\pm$ 4,51 ^b	0,002
VCL	251,34 $\pm$ 193,51 ^a	110,66 $\pm$ 18,75 ^a	199,23 $\pm$ 18,13 ^a	0,153
VSL	190,90 $\pm$ 175,14 ^a	56,93 $\pm$ 10,86 ^a	97,30 $\pm$ 6,44 ^a	0,125
VAP	167,86 $\pm$ 168,13 ^a	43,65 $\pm$ 9,92 ^a	74,49 $\pm$ 4,48 ^a	0,135
LIN	52,38 $\pm$ 11,11 ^a	39,60 $\pm$ 4,35 ^b	39,59 $\pm$ 3,88 ^{ab}	0,019
STR	77,67 $\pm$ 8,30 ^a	75,97 $\pm$ 3,51 ^a	75,15 $\pm$ 2,05 ^a	0,669
WOB	64,89 $\pm$ 9,26 ^a	51,49 $\pm$ 3,63 ^b	50,50 $\pm$ 5,05 ^b	0,004
ALH	1,81 $\pm$ 0,75 ^a	1,39 $\pm$ 0,26 ^a	1,91 $\pm$ 0,32 ^a	0,246
BCF	11,05 $\pm$ 4,19 ^a	14,39 $\pm$ 2,96 ^a	21,14 $\pm$ 1,65 ^b	0,0003