



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

“EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA FRAGMENTACIÓN
DE ADN EN SEMEN HUMANO DE DONANTE”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A

OMAR ESPINOSA RIOS

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Olga Pashkova

Instituto de Infertilidad y Genética

ASESORA INTERNA

Biol. Ma. Cristina Alvarado Domínguez

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM



17 de Noviembre de 2009.



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.

Todo lo que soy o espero ser se lo debo a la angelical sollicitud de mi madre.
Abraham Lincoln (1808-1865).

DEDICATORIA

A mi mamá que es mi todo, por su apoyo incondicional y el sacrificio que a hecho por mí hasta este día, para que yo logre mis metas, por todas las preocupaciones que le he generado, por creer en mí y nunca dejarme solo. Gracias mamá por ser tan maravillosa conmigo. Le doy gracias a Dios el que tu seas mi madre, por que eres la mejor que un hijo puede desear. A la memoria de mi padre que hasta el final estuvo al pendiente de mí, motivarme a seguir a delante y demostrarme todo lo que yo le importaba.

AGRADECIMIENTOS

- ∞ Mi **abuela Concepción** y mis tías **Francisca** y **Margarita** por todos sus consejos, ayuda y motivación para seguir adelante.
- ∞ A mi novia **Vania** por todo su apoyo incondicional y a toda su familia, especialmente a sus padres por abrirme las puertas de su casa y brindarme su confianza.
- ∞ A los contadores **Jorge Ortega** y **Beatriz Madrid**, grandes amigos de mi padre por estar al pendiente de mí después de su partida por que nunca les voy a poder pagar ese gesto tan grande.
- ∞ Mis directoras, la Dra. **Olga Pashkova**, por todo el apoyo y paciencia que me brindó en mi estancia en el Instituto y a la Biol **Cristina Alvarado** también por su gran paciencia, disposición y ser mi fuente de inspiración para conocer la biología de la reproducción.
- ∞ El M en C. **Armando Cervantes** y el Biol. **Azahariel Ramírez** que me brindaron su valiosa ayuda en la parte estadística de mi trabajo.
- ∞ Al Dr. **Felipe Camargo** que me dió la oportunidad y facilidades para realizar mi tesis en su instituto, INGENES.
- ∞ Al Dr. **Luís Gabriel Monroy** por todas sus observaciones y correcciones, así mismo al equipo de **Biólogos Jr**, (**Vane, Hugo y Marcia**) y al equipo Medico, por todas sus sugerencias para la realización de este trabajo.
- ∞ Por su tiempo y disposición en la revisión de mi trabajo a la Dra. **Ma. Elena Ayala**, Dra. **Lucila Álvarez** y a la M. en IBSH **Angélica Flores**.
- ∞ El Sr. **Salvador Román** por todos los consejos que me dió a lo largo de la carrera.
- ∞ Y por último al primer gran amigo que hice desde que llegue al DF con quien compartí grandes experiencias a lo largo de la carrera, **Ricardo** el ñoño.

INDICE

	Pág.
1. Resumen	4
2. Introducción	5
3. Marco teórico	7
3.1. Aparato reproductor masculino	7
3.2. Escroto y pene	7
3.3. Órganos internos y glándulas accesorias	8
3.3.1. Testículos	8
3.3.2. Túbulos seminíferos	9
3.3.3. Célula de Sertoli	9
3.3.4. Célula de Leydig	11
3.3.5. Epidídimo	13
3.3.6. Conducto deferente	13
3.3.7. Vesículas seminales	13
3.3.8. Próstata	14
3.3.9. Glándulas bulbouretrales o glándulas de Cowper	14
3.4. Fisiología de la espermatogénesis	14
3.4.1. Eje hipotalámico-hipofisario-gonadal masculino	18
3.5. Semen	19
3.6. Análisis del semen	20
3.7. ADN	20
3.8. ADN en el espermatozoide	21
3.9. ADN y fragmentación	22
3.10. Criopreservación	24
3.10.1. Breve reseña histórica sobre criopreservación	24
3.10.2. Fundamentos de criopreservación	25
3.10.3. Métodos de criopreservación	27
3.10.4. Crioprotectores	28
3.11. Banco de semen	29
3.12. Tanque de nitrógeno	30
3.13. Nitrógeno líquido; precauciones y propiedades físicas y químicas	32
3.14. Daños generados por la criopreservación	33

3.15. Daño al ADN por generación de radicales libres de oxígeno (ROS) derivados de la criopreservación	34
3.16. Funciones de los antioxidantes enzimáticos	34
3.16.1. SOD	34
3.16.2. GPx	34
3.16.3. CAT	35
3.16.4. GSH	35
3.17. Daño al ADN por flujo excesivo de Ca ²⁺ al interior del espermatozoide por enfriamiento inicial	37
3.18. Determinación de fragmentación de ADN espermático	38
3.18.1. Análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide (SCSA)	38
3.18.2. DBD-FISH. Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization	39
3.18.3. Test de dispersión de cromatina (SCD)	39
3.18.4. Ensayo cometa	39
3.18.5. Ensayo tunel	40
3.18.6. Ensayo <i>in situ</i> nick translation	40
4. Planteamiento del problema	42
5. Justificación	43
6. Hipótesis	44
7. Objetivo general	44
8. Objetivos particulares	44
9. Materiales y métodos	45
9.1.1. Selección de donadores	45
9.1.2. Análisis macroscópico	46
9.1.2.1.1. Aspecto	46
9.1.2.1.2. Volumen	46
9.1.2.1.3. pH	46
9.1.3. Análisis microscópico	46
9.1.3.1.1. Concentración	46
9.1.3.1.2. Movilidad	46
9.1.3.1.3. Morfología espermática	47
9.1.4. Material para criopreservación	47
9.1.5. Protocolo de congelación de muestras de semen	48

9.1.5.1.1. Preparación de la muestra	48
9.1.5.1.2. Adición de crioprotector	48
9.1.5.1.3. Proceso de criopreservación	48
9.1.5.1.4. Protocolo de descongelación de muestras de semen	49
9.1.6. Protocolo de fragmentación de ADN mediante el test SCD	49
9.1.6.1.1. Material para fragmentación de ADN	50
9.1.6.1.2. Protocolo para la realización del SCD	51
9.1.6.1.2.1.1. Inclusión de la muestra en microgel de agarosa	51
9.1.6.1.2.1.2. Procesado de la muestra	51
9.1.6.1.2.1.3. Tinción de la muestra	52
9.1.6.1.2.1.4. Tinción para observación en microscopio de campo claro	52
9.1.7. Interpretación de resultados	52
10. Análisis estadístico	54
11. Resultados	55
12. Discusión	63
13. Conclusiones	68
14. Bibliografía	69
15. Anexos	77

RESUMEN

En la actualidad los parámetros obtenidos a través de un seminograma convencional (concentración, movilidad, morfología) no aportan una información completa sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides en la muestra y de dar lugar a la fertilización, embriones sanos y un embarazo normal, por tal motivo se requiere determinar algún otro parámetro como es el índice de fragmentación del ADN espermático (DFI).

Para complementar este estudio básico del semen se realiza el test SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*) que mide el grado de fragmentación en el ADN espermático; esta prueba fue aplicada a 40 muestras de semen de donante del Instituto de Infertilidad y Genética, para determinar si tras el proceso de criopreservación las muestras presentaban un incremento en la fragmentación de ADN.

La medición del DFI se realizó en muestras en fresco y después de la congelación, se encontró diferencia estadística significativa en aquellas catalogadas con calidad excelente y bueno, para las muestras de mala calidad no se encontró relevancia estadística. Esto muestra que el proceso de congelación y descongelación de los gametos masculinos genera un aumento en la fragmentación de la molécula del ADN por la generación de radicales libres de oxígeno (ROS), además la motilidad también se vio afectada por este proceso de conservación; sin presentar cambios en la morfología y concentración de las muestras.

No se encontró relación entre los parámetros seminales de concentración y movilidad en fresco y postdescongelado con el índice de fragmentación, pero sí con la morfología, así mismo se encontró una correlación significativa entre el DFI y la tasa de embarazo obtenido por las muestras de los individuos, lo que podría sugerir que los test para determinar la fragmentación pueden ser utilizados como parámetro confiable en los resultados de las técnicas de reproducción asistida.

Palabras clave: Fragmentación de ADN, Espermatozoide, Criopreservación.

INTRODUCCIÓN

La finalidad del espermatozoide es de aportar una copia haploide para que junto con el oócito también haploide se lleve a cabo la fecundación. Para que esta función se realice, el hombre debe de producir espermatozoides en calidad y cantidad suficiente. Los progresos recientes en el área de biología de la reproducción han mejorado la comprensión de la fisiología espermática y de los mecanismos implicados en la fecundación; este nuevo conocimiento ha contribuido al desarrollo de pruebas de fertilidad masculina basadas en la *integridad del genoma del espermatozoide* (Sergeie *et al.*, 2005). Un espermatozoide que se considere de calidad óptima para ser utilizado en las técnicas de reproducción asistida debe cumplir con una serie de parámetros de calidad bien. Pero es la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN) la que debe albergar el menor número de errores posibles para producir una descendencia normal. Si la molécula del material genético se transmite con daños que afecte a una, o a las dos cadenas de la molécula, se puede generar un resultado letal sobre el embrión, por tanto la integridad de dicha molécula en el espermatozoide es un requisito indispensable para lograr un correcto desarrollo embrionario y obtener un embarazo normal (Gosálvez, 2008).

Con los avances en las técnicas de reproducción asistida se hace necesario profundizar más en el estudio del fluido seminal, debido a que el seminograma básico no es suficiente para evaluar con precisión la calidad del espermatozoide (Dorado *et al.*, 2008).

La fragmentación de ADN se define como roturas o lesiones en el material genético del espermatozoide. Normalmente, el material genético del espermatozoide es muy estable gracias a su organización característica (Agarwal y Allamaneni, 2005). Con base en la literatura la fragmentación es un fenómeno multifactorial y no del todo delimitado, algunos de estos factores son: generación de radicales libres, empaquetamiento anormal de la cromatina, deficiencias en la recombinación; causas externas como contaminación, tabaquismo, temperatura testicular elevada o patologías como criptorquidia, varicocele, infecciones del tracto genital, cáncer entre otros (Morales *et al.*, 2007).

Durante el proceso de criopreservación también se produce fragmentación en la molécula del ADN, sin embargo este proceso de preservación espermática ha permitido avanzar en el conocimiento y lograr maximizar la supervivencia de los espermatozoides, pero no de la integridad de la molécula del ADN de todos los espermatozoides que se encuentran en la

muestra. La criopreservación de los espermatozoides favorece la generación de radicales libre (ROS) de O₂, por la presencia de gametos muertos y exceso de citoplasma en los mismos, así como también por tipos celulares ajenos al eyaculado (linfocitos), endonucleasas etc, lo que “puede” representar hasta cierto punto un daño acumulativo para los demás espermatozoides (y para su genoma) presentes en la misma muestra congelada y favorecer la fragmentación del ADN. Sin embargo los ROS también se pueden formar a partir de moléculas estables utilizando diversos sustratos de los espermatozoides (Membrillo *et al.*, 2003).

MARCO TEÓRICO

El testículo humano tiene dos funciones especiales: 1) la producción y maduración de espermatozoides (espermatogénesis), y 2) la síntesis de la secreción de hormonas sexuales (esteroidogénesis). En la espermatogénesis se distinguen tres fases: la espermatogénica o fase proliferativa, espermacitogénica y espermiogénesis. Esta última etapa es un proceso de transformación, de las espermátides en espermatozoides, células muy especializadas. Entre los cambios más evidentes que acontecen durante la espermiogénesis, destacan el desarrollo del acrosoma y del flagelo, así como la condensación del material genético en el núcleo y la pérdida de citoplasma (Gil *et al.*, 2002).

Aparato reproductor masculino

Incluye desde órganos externos como pene y escroto hasta las glándulas accesorias como próstata, de Cowper, vesículas seminales entre otras (figura1).

Escroto y pene

El escroto es una bolsa que cuelga detrás del pene, suspendida del pubis. Es continuación de la pared abdominal y esta dividida por un tabique en dos sacos, cada uno de los cuales contienen y sostiene uno de los testículos con su epidídimo. Esparcidas en el tejido subcutáneo del escroto se encuentran fibras de músculo liso (dartos). Las fibras del dartos se contraen por acción del frío y disminución de la temperatura corporal y producen las arrugas características en el escroto. Esta contracción del dartos eleva los testículos hasta cerca del perineo donde pueden absorber calor corporal y mantener la temperatura compatible con la vida de los espermatozoides. El pene, u órgano de cúpula es una estructura flácida cuando no esta estimulada, se halla conectado a las paredes anterior y externa del arco púbico por delante del escroto y esta compuesto de tres columnas longitudinales de tejido eréctil unidas por bandas fibrosas cubiertas de piel, dos de las columnas longitudinales están localizadas lateralmente y se llaman cuerpos cavernosos, la tercera columna conocida como cuerpo esponjoso o cuerpo cavernoso de la uretra es la columna media situada entre los cuerpos cavernosos; contiene la uretra, que conduce la orina y el semen, en su extremo distal, el cuerpo distal de la uretra es más voluminoso y forma al glande en el cual esta localizado el orificio de la uretra. Sobresaliendo del glande esta el prepucio (Stanley *et al.*, 1982).

Órganos internos y glándulas accesorias

Testículos

Los testículos son dos órganos situados dentro de la cavidad abdominal, el izquierdo un poco más bajo, debajo del pene y localizados en el escroto, tienen forma ovalada, con un diámetro mayor de unos 4 cm, una anchura de 3 cm y un espesor de 2.5 cm, y cada uno de ellos pesa alrededor de 20 g. La superficie del testículo es lisa y brillante, de color blanco, formada por una cubierta fibrosa denominada albugínea, muy tensa, lo que le confiere una consistencia dura. Por su cara posterior, el testículo está en contacto con el epidídimo, una estructura que forma parte de las vías espermáticas y en la que se distinguen tres porciones: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza del epidídimo emerge del polo superior del testículo, y el cuerpo y la cola descienden adosados a su cara posterior. Entre ambos testículos, las diferentes capas (excepto la piel) forman un tabique escrotal que llega hasta la raíz del pene. En la piel, entre los dos testículos, hay un rafe escrotal que se continúa hacia el ano para formar el rafe perineal. Desde el testículo hasta la piel queda un resto de gubernáculo embrionario que arrastró el testículo fuera de la cavidad abdominal: es el ligamento escrotal. La capa externa del testículo se conoce como *túnica albugínea*, que es una estructura densa de tejido fibroso blando, que en su borde posterior se refleja dentro del testículo, formando un tabique vertical llamado *mediastino del testículo* (Baily *et al.*, 2003).

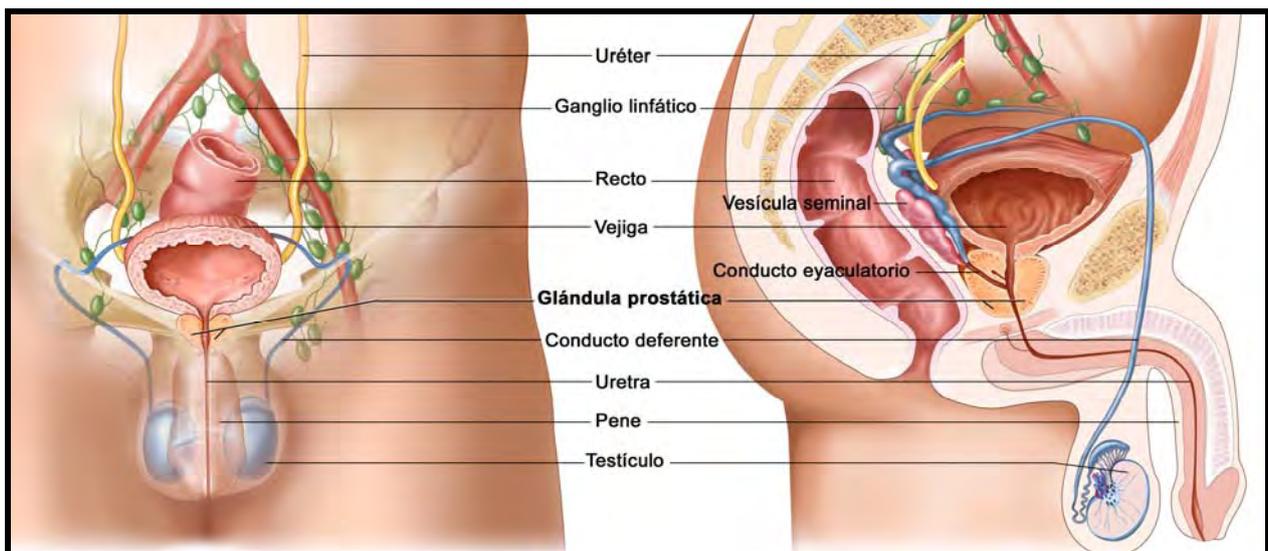


Figura 1: Aparato reproductor masculino (III).

Túbulos seminíferos

Los túbulos seminíferos tienen un diámetro de unas 300 micras. La pared que los limita está formada, de dentro afuera, por la membrana basal, fibroblastos y células peritubulares mioideas con capacidad contráctil. En el interior de los túbulos seminíferos se distinguen las células de Sertoli y las células germinales. La célula de Leydig está localizada entre los túbulos seminíferos, en el intersticio testicular, forma grupos y están cerca de vasos sanguíneos (Marina, 2003).

Célula de Sertoli

Las células de Sertoli son células epiteliales somáticas que proceden de células de la superficie del mesonefros. Estas células proliferan en el embrión de alrededor de 36 días. En el embrión masculino de 8 semanas las células de Sertoli están organizadas en cordones y separadas del intersticio por una membrana basal. En el varón adulto estas células están situadas en el epitelio seminífero y proveen el soporte físico y nutricional para la maduración de las células germinales, por lo que son consideradas como células de sostén con función nutritiva; estas producen lactato, que es un sustrato metabólico utilizado por las células germinales en estado avanzado. Después, las células de Sertoli no experimentan más divisiones celulares. Cada célula permanece en contacto hasta con otras cinco células del mismo tipo y con muchas más células germinales en diferentes fases de desarrollo (Tresguerres *et al.*, 1999; Berne y Koeppin, 2006). En la célula de Sertoli se expresa el gen TDF (Testicular Differentiating Factor) y el gen de la hormona antimülleriana localizado en el cromosoma 19.

La influencia de las células de Sertoli en la diferenciación del testículo es decisiva. Son de tipo columnar arborescente y su otro extremo bordea la luz tubular. Presentan múltiples digitaciones que envuelven a las células germinales. Tienen un núcleo indentado y un gran nucleolo, las prolongaciones ectoplasmáticas de las células de Sertoli y germinales se invaginan en las membranas plasmáticas de cada una de las otras (figura 2). Las células de Sertoli, experimentan cambios periódicos en íntima asociación con el ciclo de la espermatogénesis: de la actividad y forma de su núcleo, del tamaño, forma y ramificación de las prolongaciones citoplasmáticas, de la concentración de lípidos y glicógeno de la función mitocondrial y del contenido enzimático; estas modificaciones se relacionan con el

procesamiento de las células germinales de modo íntimo y periódico (Marina, 2003; Berne y Koepin, 2006).

Estas células mantienen la barrera hematotesticular y esta a su vez aísla el compartimiento adluminal para crear una barrera inmunológica que además suministra el microambiente para el correcto desarrollo de la espermatogénesis y ayude a establecer un gradiente osmótico que facilite el movimiento del líquido a la luz tubular. Las células de Sertoli sintetizan y secretan una gran cantidad de sustancias que pasan a la luz del túbulo, las más importantes 1) la proteína transportadora de andrógenos (ABP), 2) que se sintetizan en la célula de Leydig y en la célula de Sertoli se aromatizan a estrógenos, 3) inhibinas, hormonas proteicas que inhiben la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) por la hipófisis anterior, 4) activinas, estructuralmente relacionadas con las inhibinas, que además de estimular la secreción de FSH en las gonadotropas ejercen otras funciones endocrinas y paracrinas; 5) transferrina testicular transporta hierro hasta las células germinales; 6) factor de crecimiento de los túbulos seminíferos (SGF), que regula la proliferación de las células germinales, y un factor semejante al liberador de gonadotropinas. Las sustancias procedentes de los capilares y células del intersticio no tienen acceso libre al compartimiento adluminal del túbulo seminífero. La célula de Sertoli tiene receptores para la FSH y la testosterona pero no para la hormona luteinizante (LH). La acción de la FSH y la testosterona sobre la espermatogénesis es a través de la célula de Sertoli. Las células de Sertoli reciben estímulos endocrinos (FSH) y parácrinos procedentes de las células de Leydig, de las células mioides peritubulares y de las células germinales (Tresguerres *et al.*, 1999; Marina, 2003).

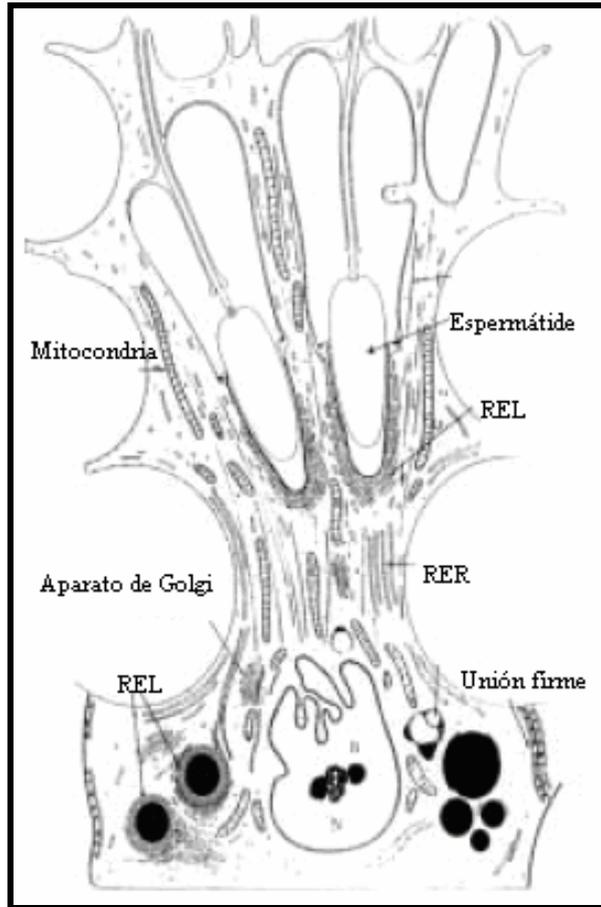


Figura 2: Célula de Sertoli; N: Núcleo; n: nucleolo; REL: retículo endoplásmico liso; RER: retículo endoplásmico rugoso (modificado de Marina, 2003).

Célula de Leydig

Tienen forma poligonal y un volumen de unas tres micras cúbicas. Todas las células de Leydig suponen menos del 10% del volumen testicular (figura 3). Estas células en estado maduro no se dividen, en el testículo infantil son casi inexistentes y casi no secretan testosterona, pero son numerosas en el recién nacido durante los primeros meses de vida y en el varón adulto en cualquier momento después de la pubertad; en estas dos etapas, los testículos secretan grandes cantidades de testosterona. Las mitocondrias de estas células son prominentes; están en contacto con el retículo endoplásmico liso (SER) y presentan “crestas tubulares”. El núcleo es redondeado y habitualmente único. El nucleolo es prominente y suele ser único. Los andrógenos sintetizados en las células de Leydig salen del testículo a través de los vasos linfáticos, sanguíneos y de los túbulos seminíferos. En el intersticio también se encuentran fibroblastos y células sanguíneas como linfocitos, macrófagos, células plasmáticas, monolitos, mastocitos, vasos sanguíneos y linfáticos

(Guyton y Hall, 2001; Marina, 2003). Las células de Leydig sintetizan y secretan varias hormonas esteroideas que se conocen globalmente como andrógenos (figura 4), es decir, todas aquellas hormonas que estimulan el crecimiento del tracto reproductor masculino. Entre los andrógenos más importantes producidos por el testículo son la: testosterona, dihidrotestosterona y la androstenediona. La cantidad de testosterona sintetizada es tan grande en relación con las otras dos hormonas que puede considerársele como el andrógeno testicular, representando el 95% de la testosterona presente en plasma de hombres normales (Tresguerres *et al.*, 1999).

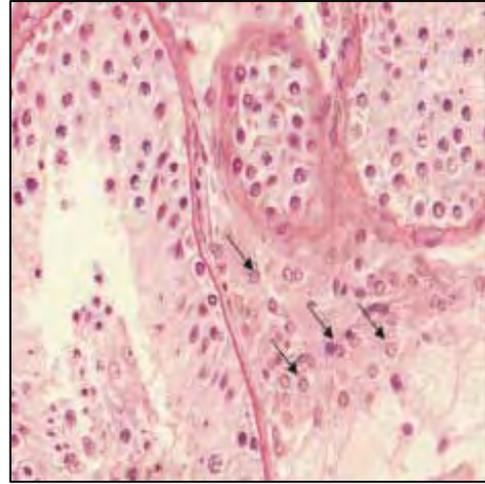


Figura 3: Células de Leydig. Las flechas señalan los núcleos (Marina, 2003).

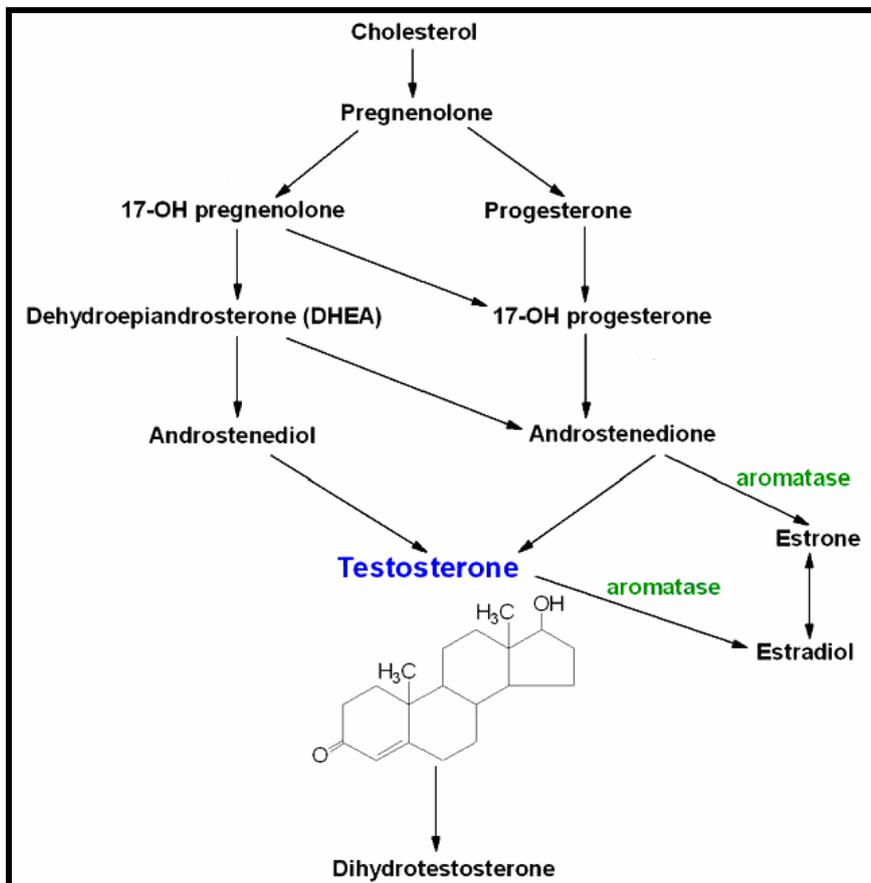


Figura 4. Ruta de síntesis de la testosterona (VIII).

Epidídimo

En esta estructura los espermatozoides maduran, adquieren moviendo y se almacenan. Mide 600 cm. cuando se estira, la cola del epidídimo se continúa con el conducto deferente, más ancho y menos sinuoso; asciende hacia el polo superior del testículo a lo largo de la cara interna del epidídimo y sale de la bolsa escrotal hacia el conducto inguinal. En este trayecto forma parte del cordón espermático, junto con los vasos espermáticos, arteria deferente, linfáticos y fibras nerviosas, todo ello envuelto en fibras del músculo cremaster (Baily *et al.*, 2003).

Conducto deferente

El conducto deferente tiene una consistencia dura y una longitud de unos 40 cm. Entra en la cavidad abdominal con el cordón espermático por el conducto inguinal, pasando por delante de la rama pubiana, junto a la espina del pubis. Dentro de la cavidad abdominal el conducto deferente se separa de los demás componentes del cordón espermático y se dirige hacia atrás por debajo del peritoneo, cruza los vasos ilíacos externos por delante y se adosa a la cara lateral de la vejiga. Cruza por encima del uréter y busca la cara posterior de la vejiga, entre ésta y el recto, descendiendo por debajo del uréter hacia la próstata, sobre la cual contacta con la vesícula seminal. En este último trayecto se ensancha formando la ampolla del conducto deferente. El conducto deferente mantiene la morfología epitelial del conducto epididimario, pero su capa muscular es mucho más gruesa y está formada por tres láminas de fibras: una interna (longitudinal) otra media (circular) y una lámina externa donde las fibras musculares vuelven a adoptar una disposición longitudinal. Rodeando a la capa muscular existe una adventicia de tejido conectivo denso. La estructura de la ampolla es la misma que la del resto del conducto deferente, sirve de reservorio de las células espermáticas, tiene la capacidad de sintetizar colesterol, testosterona y dihidrotestosterona. (Baily *et al.*, 2003).

Vesículas seminales

Son glándulas secretoras revestidas de un epitelio que secreta un material mucoide que contiene fructosa en abundancia, así como otras sustancias nutrientes y grandes cantidades de prostaglandinas y fibrinógeno. Durante la eyaculación cada vesícula seminal vacía su contenido hacia el conducto deferente poco tiempo después de que el conducto deferente vacía los espermatozoides. Esto aumenta el volumen del semen eyaculado y la fructosa y

otras sustancias del líquido seminal le proporcionan los nutrientes a los espermias eyaculados (Stanley *et al.*, 1982).

Próstata

Cuerpo cónico del tamaño de una nuez, situada en la parte inferior de la vejiga, secreta un líquido de color blanquecino alcalino claro de aspecto lechoso que contiene ácido cítrico, fosfatasa ácida, (la característica alcalina esencial del líquido prostático puede ser muy importante para una fertilización del oocito) que ayuda a la motilidad de los espermatozoides, lo que se logra hasta que el pH de los líquidos vecinos se eleva de 6 a 6.5 (Stanley *et al.*, 1982; Baily *et al.*, 2003).

Glándulas bulbouretrales o glándulas de Cowper

Secretan en la uretra un líquido alcalino, mucoso, con un alto contenido en ácido siálico, que lubrica sus paredes justo antes de que llegue el eyaculado (Guyton y Hall, 2001).

FISIOLOGÍA DE LA ESPERMATOGÉNESIS

La capacidad reproductiva del hombre adulto está condicionada por la espermatogénesis. La producción continua de un número adecuado de gametos masculinos funcionalmente competentes depende de múltiples factores, y su disrupción parcial o total representa la mayor parte (alrededor del 80%) de las causas de subfertilidad o esterilidad masculina. La espermatogénesis se divide en tres fases (Bassas, 2001):

- a) Multiplicación y renovación por mitosis de las células germinales primordiales, las espermatogonias.
- b) Meiosis, que reduce el número cromosómico a la mitad, para dar lugar a células haploides, con una 1° y 2° división que origina espermatozoides secundarios, y finaliza con la formación de los espermátides redondas.
- c) Diferenciación y maduración de los espermátides, para dar origen a los gametos masculinos, espermiogénesis.

La espermatogénesis ocurre en los túbulos seminíferos desde la pubertad, esta requiere de una elevada sincronización, para que se produzca una población de espermatozoides morfológicamente normales, en adecuada concentración, y viables para fertilizar el

ovocito; una de sus características es que tiene una gran resistencia al daño (Guzmán *et al.*, 2005; Bouvet *et al.*, 2007). Los túbulos tienen gran número de células germinales, las cuales están situadas en dos o tres capas a lo largo del borde externo del epitelio tubular. Una parte de ellas proliferan y se diferencian siguiendo las etapas del desarrollo para formar espermatozoides. Durante la primera etapa de la espermatogénesis las células germinales, localizadas junto a la membrana basal del epitelio denominadas espermatogonias tipo A, se dividen por mitosis y originan células un poco más diferenciadas llamadas espermatogonias tipo B. Después de varias divisiones mitóticas adicionales estas células se convierten en espermatocitos primarios de gran tamaño, los que se a su vez se dividen por meiosis para formar dos espermatocitos secundarios, los cuales generan cuatro espermátides. Cada una de ellas cambia gradualmente hasta convertirse en un espermatozoide por medio de la pérdida de citoplasma, de la reorganización del material cromatínico del núcleo, de la formación de una cabeza compacta, de la acumulación del citoplasma residual y de la membrana celular en un extremo de la célula para formar la cola. El proceso completo de espermatogénesis dura aproximadamente 75 días. La diferenciación de las células germinales masculinas, de espermatogonia a espermatozoide en el epitelio seminífero, es controlada por: hormonas, factores de crecimiento, temperatura e interacción con las

células de Sertoli. El proceso de espermatogénesis se detiene en la fase de meiosis (figura 4) (Málaga *et al.*, 2005).

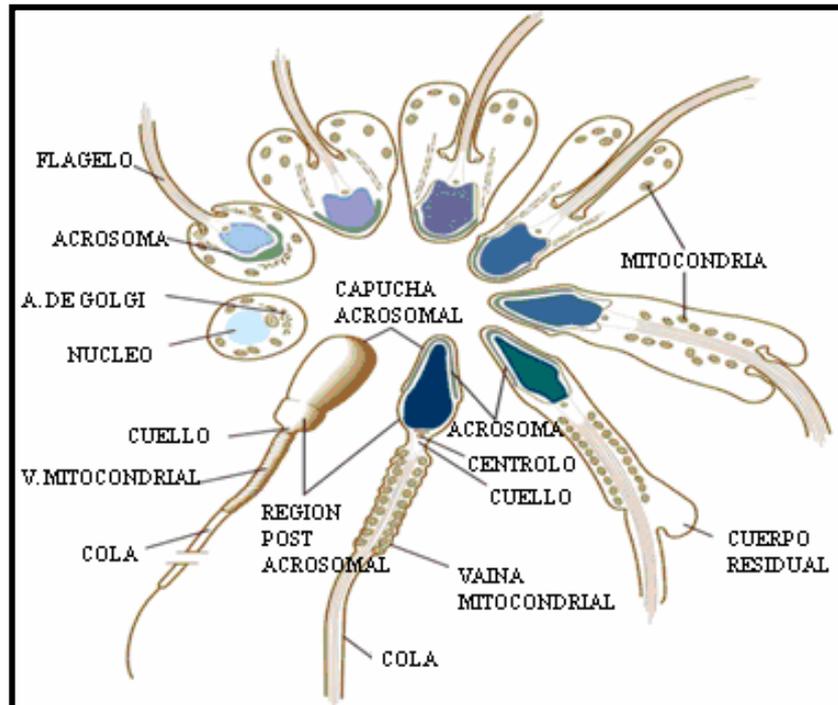


Figura 5: Diferenciación celular de la espermátide a espermatozoides (modificado de III).

En el proceso de espermiogénesis, transformación de las espermátides en espermatozoides se reconocen cuatro fases características:

1. En la **fase de Golgi**, el organelo del mismo nombre se acerca al núcleo, desprende vesículas que se le superponen y poco a poco se unen para convertirse en la vesícula acrosomal que se localiza en la parte apical del núcleo. Los centríolos situados en forma de T, muy cercanos al aparato de Golgi, van migrando hacia lo que será la base del núcleo. El centríolo proximal se sitúa en la parte basal del núcleo y, a partir del centríolo distal crece el axonema conformado por dos microtúbulos centrales y 9 pares de microtúbulos periféricos (Olivera *et al.*, 2006).
2. En la **fase de capuchón**, la vesícula acrosomal se aplana formando una verdadera capucha sobre el núcleo. El núcleo se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas (Fase G₀ del ciclo celular). La inactividad transcripcional del núcleo hace que el espermatozoide sea dependiente de modificaciones postranscripcionales como la fosforilación de proteínas necesarias para adaptar su función de acuerdo a las necesidades. Las fosforilaciones ocurren desde las células germinales, casi siempre en los residuos de tirosina, distinto a otras células eucarióticas en las que la mayoría de las fosforilaciones ocurren en residuos de serina y treonina (Olivera *et al.*, 2006).
3. En la **fase acrosomal** la espermátide gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal; se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media. En esta fase el espermatozoide adquiere su morfología definitiva (Olivera *et al.*, 2006).
4. Finalmente, la **fase de maduración**, donde se observan las características finales de los espermatozoides: forma de la cabeza característica de cada especie (oval y plana), cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma; y la cola compuesta por las piezas media, principal y terminal (véase figura 5 y 6); en la pieza media se encuentran las mitocondrias en forma de hélice. En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal de la cola

originando la llamada gota citoplasmática. El proceso de maduración termina con la espermiación, o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero. Mediante movimientos peristálticos los espermias son transportados de la *rete testis* a los conductos deferentes y de allí al epidídimo en cuya cola se almacenan (Olivera *et al.*, 2006).

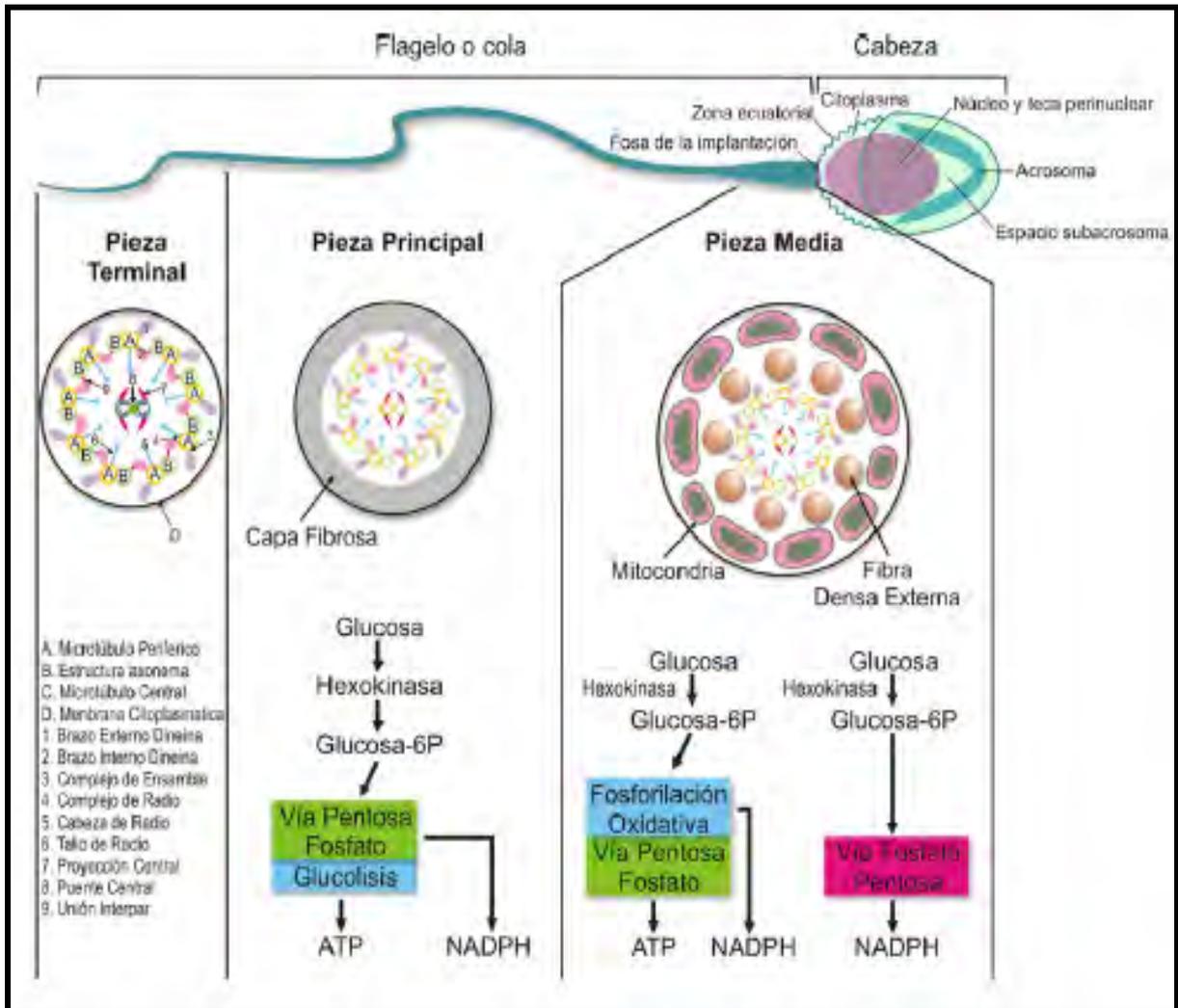


Figura 6: Morfología espermática y metabolismo energético que realiza esta célula a partir de glucosa en la pieza principal y pieza media (Olivera *et al.*, 2006).

Eje Hipalámico-Hipofisiario-Gonadal masculino

El eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal masculino es un sistema de retroalimentación de múltiples componentes, pero integrada con control interglandular (autocrinos y paracrinos) en cada nivel principal del eje y comunicación intraglandular entre los centros de control principales (por ejemplo, la hipófisis envía señales al testículo, y el testículo envía señales a la unidad hipotálamo-hipofisaria) (figura 7). El eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal del hombre sano tiene dos funciones principales que son esenciales para la reproducción en el hombre, estas son: 1) la producción de cantidades fisiológicas de las hormonas esteroides sexuales apropiadas, incluyendo andrógenos, y 2) la generación de células espermatogénicas sanas que se transformarían en gametos masculinos capaces de fertilizar el oocito (Yen *et al.*, 2001).

El hipotálamo sintetiza la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), un decapeptido sintetizado en el núcleo arcuato del hipotálamo, que alcanza la hipófisis a través del sistema portal hipofisiario. La GnRH se encarga de estimular la secreción de la LH y FSH en las células gonadotropas de la adenohipófisis. La secreción de la GnRH es pulsátil; la frecuencia y amplitud de los pulsos determinan el modo de secreción de las gonadotropinas (Gil *et al.*, 2002).

La LH actúa sobre las células de Leydig y estimula la producción de testosterona, y la FSH actúa sobre los túbulos seminíferos en las células de Sertoli estimulando la espermatogénesis. La testosterona mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, frena la liberación de LH, mientras que la inhibina, hormona producida por las células de Sertoli, frenan la liberación de FSH, este circuito asegura que no haya sobreproducción de testosterona ni de espermatozoides, sino valores constantes con solo pequeñas variaciones (Tesone, 2006).

El proceso espermatogénico, requiere entre otros factores de una alta concentración de testosterona. La espermatogénesis y sobre todo la meiosis es testosterona dependiente. La concentración de esta hormona en el tubo seminífero es 100 a 200 veces mayor que en sangre periférica (Morse *et al.*, 1973). Esta elevada concentración de andrógenos se logra porque los grupos de células de Leydig, están próximos a los túbulos seminíferos; y la

testosterona se difunde a la célula de Sertoli además de a los vasos sanguíneos y linfáticos (Marina, 2003).

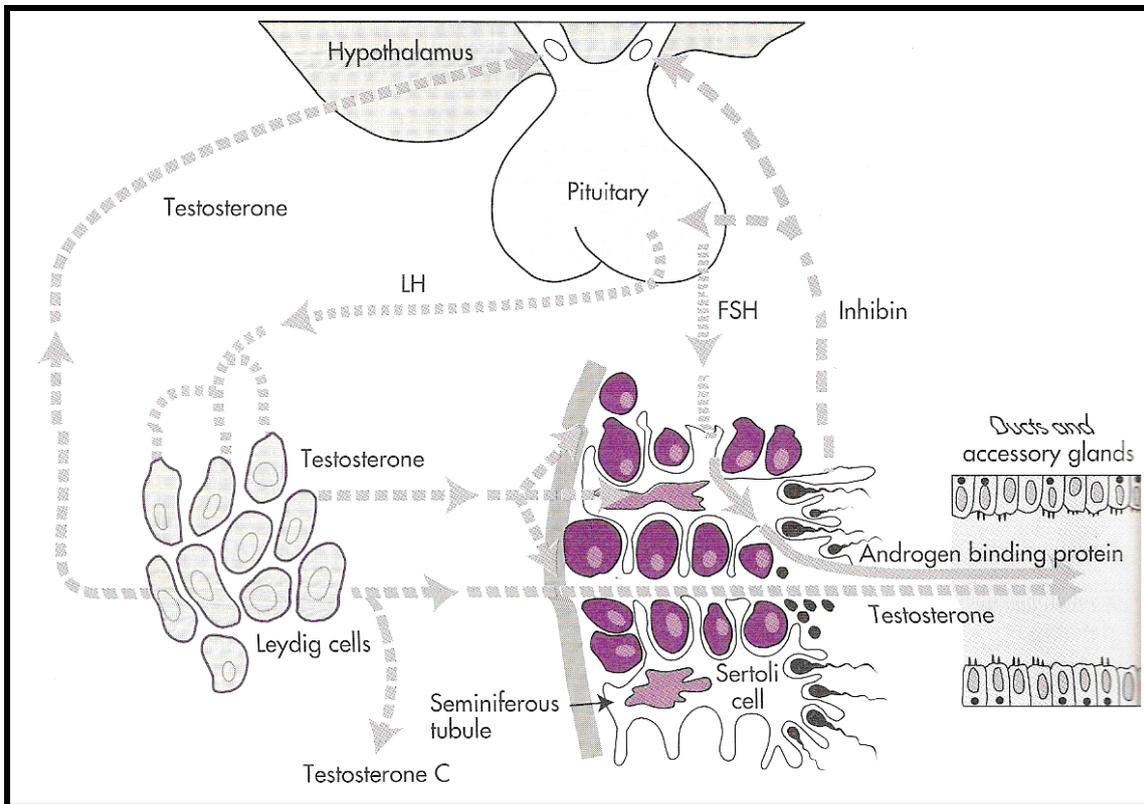


Figura 7: Eje hipotálamo-hipófisis y producción de testosterona (Burns y Donal, 1996).

SEMEN

El semen es una mezcla de espermatozoides y secreciones de las vesículas seminales, el volumen promedio normal es de 2 a 5 mililitros y el número aproximado de espermatozoides eyaculados es de 20 a 200 millones por mililitro. El líquido seminal es un medio de transporte para los espermatozoides, además de aportarles nutrientes como (Poirot y Cherruau, 2005):

- Iones minerales: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} .
- Glúcidos: poca glucosa (0,39 mmol/L) sobre todo fructosa producida a partir de la glucosa sanguínea.

- Ácidos orgánicos: Ácido cítrico que contribuye al mantenimiento de la presión osmótica del esperma; Ácido ascórbico protector de los espermatozoides de cara a los radicales libres.
- Lípidos: tres veces menos que en el plasma sanguíneo: Colesterol, glicerofosforilcolina.
- Esteroides: testosterona, deshidroepiandrosterona.
- Constituyentes de pequeña masa molecular: aminoácidos, acetilcarnitina, espermidina, espermita, glutatión.
- Proteínas: Albúmina, α globulina, β globulina y γ globulina.

ANÁLISIS DEL SEMEN

El propósito fundamental del análisis del semen radica en evaluar los parámetros descriptivos clásicos en una muestra obtenida por masturbación (concentración, pH, volumen, fructuosa, vitalidad, movilidad y morfológica de los espermatozoides). Aunque de los resultados de este análisis no se puede deducir si un varón puede llegar a ser fértil, debido, a que no revela defectos en el espermatozoide que afecten la integridad del gameto masculino, sin embargo, puede ayudar en la investigación de las posibles causas de infertilidad (Mollá *et al.*, 2005; Gutiérrez, 2007). Por tanto los parámetros seminales clásicos más la evaluación de la integridad del ADN en el espermatozoide, nos podrá aportar una información extra acerca de la calidad del espermatozoide (Agarwal y Allamaneni., 2005).

Ver en anexos valores seminales de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

ADN

Los cromosomas están formados de ADN y proteínas; al principio se pensó que las proteínas eran el material genético debido a que una molécula de proteína pueden presentar variedad casi infinita necesaria para explicar la existencia de tantos genes diferentes, sin embargo a medida que se estudio la estructura del acido nucleico se encontró que tenia potencial para una gran variabilidad, se le identifico como ADN, esta es una molécula especializada en almacenamiento y control de la información genética, esta formada por seis componentes: una molécula de azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y cuatro bases

nitrogenadas diferentes (adenina, guanina, timina y citosina). La unidad básica del ADN se denomina nucleótido, o más precisamente desoxinucleótido y sus propiedades fisicoquímicas son; 1) estabilidad gracias a que carece de un grupo hidroxilo en el carbono dos del anillo ribosa; 2) se presenta siempre en doble hélice, que le otorga fidelidad en la replicación, haciendo copias exactas de la misma molécula y la capacidad de reparación en caso de que una de las hebras se altere. Sin embargo el ADN puede ser alterado por acción de diversos agentes fisicoquímicos de origen extracelular como, por ejemplo, los radicales libres de oxígeno (Winchester, 1985; Roche y Romero-Alvira, 1996; Kreuzer y Massey, 2001).

En una molécula de ADN, miles o millones de nucleótidos forman una cadena uniendo el grupo fosfato del carbono 5 de una molécula de desoxirribosa con el carbono 3 de otra molécula de desoxirribosa, originándose una molécula de agua libre al producirse la unión. Las uniones formadas entre las moléculas de desoxirribosa por el puente fosfato se denominan uniones fosfodiéster. Debido a que los nucleótidos se mantienen unidos por uniones entre sus grupos fosfato y desoxirribosa se dice que el ADN tiene un esqueleto azúcar-fosfato. El esqueleto es importante pero toda la información está contenida en las cuatro bases; adenina-timina y guanina-citosina (Kreuzer y Massey, 2001).

ADN EN EL ESPERMATOZOIDE

Como ya se mencionó en líneas anteriores la formación de los espermatozoides maduros es un proceso complejo, el cual comprende una serie de divisiones mitóticas y meióticas, cambios en la arquitectura citoplasmática; la sustitución de histonas por protaminas, las cuales son muy ricas en arginina y poseen residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro que confieren un alto grado de compactación a la cromatina espermática madura (la cromatina es el conjunto de ADN y proteínas que se encuentran en el núcleo de las células espermáticas y que constituyen a los cromosomas) de acuerdo con Sakkas *et al* en 1999, los espermatozoides humanos contienen altos porcentajes de protaminas; más del 85% y son aproximadamente la mitad del peso molecular de las histonas y son 50% más básicas que estas últimas, debido a lo citado con anterioridad, el ADN de los espermatozoides se encuentra seis veces más compactado que el del cromosoma mitótico y se organiza en bucles de menor tamaño que los de las células somáticas. Todo lo anterior le

confiere al espermatozoide una estructura muy estable y rígida, de naturaleza casi paracristalina y muy difícil de desorganizar. La mayoría de las técnicas existentes para el estudio de cualquier peculiaridad en este tipo celular deberá sortear esta barrera física (Manicardi *et al.*, 1995; Gosálvez *et al.*, 2007). Probablemente los espermatozoides que presenten un mayor grado de daño de ADN sean aquellos que tengan un menor grado de entrecruzamiento de puentes disulfuro en la cromatina durante su maduración en el epidídimo (Álvarez, 2005).

ADN Y FRAGMENTACIÓN

El ADN del espermatozoide aporta la mitad de los cromosomas que se requieren para la fecundación. Recientemente, la integridad de dicha molécula, en el espermatozoide se está reconociendo como una medida independiente de su calidad. Se ha demostrado que la calidad del ADN del espermatozoide puede afectar la fertilidad *in vivo* e *in vitro* (Agarwal y Allamaneni., 2005). El daño o fragmentación en el ADN de los espermatozoides es considerado como una causa importante de infertilidad y ha despertado particular interés debido al riesgo que implica la transmisión de defectos genéticos a la descendencia, en especial, cuando se utilizan Técnicas de Reproducción Asistida (TRA, se define como el tratamiento de la esterilidad o infertilidad que conlleva una manipulación de los gametos, IV) específicamente la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) donde no es posible realizar una selección espermática que permita excluir espermatozoides con daño genético (Smith *et al.*, 2007). La fragmentación de ADN se define como roturas o lesiones en el material genético del espermatozoide; esta fragmentación se debe a fenómenos multifactoriales como: generación de radicales libres asociados a procesos REDOX originados por espermatozoides inmaduros, leucocitos, eritrocitos, alteraciones durante el proceso de empaquetamiento de la cromatina, debido a errores en el funcionamiento de las endonucleasas, activación de caspasas y endonucleasas en espermatozoides diferenciados por factores físico-químicos relacionados con un aumento de temperatura (Gosálvez, 2008; Álvarez, 2005), ciertos acontecimientos relacionados con la apoptosis (muerte celular programada) que no funcionen correctamente (Aguilera *et al.*, 2008); sin embargo la fragmentación también es provocada por agentes de naturaleza exógena, como el uso de ciertos fármacos, contaminación atmosférica, tabaquismo, temperatura testicular elevada (Gosálvez *et al.*, 2007), o por causas

patológicas como criptorquidia, varicocele, procesos inflamatorios o infecciones en el tracto genital, cáncer, episodios febriles, estrés (Morales *et al.*, 2007).

En este escenario de causas intrínsecas como extrínsecas del daño provocado a la molécula del ADN del espermatozoide se ha sugerido que la salud del embrión, feto e incluso de la descendencia se puede ver afectada; en caso de que el daño al ADN sea compatible con la vida puede dar como resultado un niño con diversas anomalías congénitas; causando desde la propia infertilidad al nuevo individuo, cáncer infantil, hasta enfermedades de impronta genética (Agarwal y Allamaneni, 2005; Gosálvez *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2008). Cuando espermatozoides con un amplio daño en el ADN son utilizados (y el ovocito no puede repararlo) el embrión puede fallar al implantarse o desarrollarse en el útero, o puede ser naturalmente abortado en etapas posteriores. Se puede afirmar en general, que cuanto mayor sea el daño de ADN transmitido al embrión por el genoma del espermatozoide, antes se va a manifestar en el proceso de desarrollo embrionario, a lo anterior se le ha denominado efecto paterno temprano y tardío respectivamente (Agarwal y Allamaneni, 2004; Álvarez, 2005; Morales *et al.*, 2007).

Sin embargo, durante el almacenamiento a bajas temperaturas (criopreservación), también se puede producir daño al material genético de los espermatozoides por diferentes factores. La congelación (criopreservación) de semen se define como el tratamiento empleado para la conservación y el mantenimiento de los espermatozoides a temperaturas de -196°C (Meseguer *et al.*, 2002) y tiene como objeto el mantenimiento de la viabilidad y función celular a bajas temperaturas; la criobiología estudia los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y las bajas temperaturas detienen este tiempo, puesto que hace más lentas las reacciones. La obtención de un protocolo ideal para criopreservar es dependiente del conocimiento de las diferentes propiedades fisicoquímicas de la célula o tejido, puesto que este proceso está afectado por diferentes variables como especie, tipo y estadios de la célula a congelar (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). Una de las razones por las cuales se congelan más espermatozoides que oocitos, se deben a que siempre se tiene más espermatozoides que gametos femeninos, aun en casos severos de infertilidad masculina (Bisioli, 2006).

CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación del semen y su utilización en las técnicas de inseminación artificial, ha causado un gran impacto sobre la reproducción en animales y en el hombre. Innumerables crías de diferentes especies han nacido a partir del uso de semen congelado. Mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide (como el estrés oxidativo generado por ROS, que provoca la pérdida de las funciones espermáticas; Alba *et al.*, 2000), desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (Stornelli *et al.*, 2005). Son poco conocidos los eventos físicos y bioquímicos que ocurren durante la congelación, almacenamiento y descongelación en el espermatozoide, así como los métodos para detectar daños criogénicos. Es de este modo como las células sobrevivientes pueden presentar lesiones estructurales y cambios metabólicos que limitan su función biológica. Dichos efectos ocurren incluso si el periodo de congelación es muy corto, por lo que resultan inevitables (Góngora *et al.*, 2003).

Breve reseña histórica sobre criopreservación

La historia de la criopreservación de semen humano data de más de 225 años atrás (1776), cuando Lázaro Spallanzani reportó experimentos de congelación seguidos de recuperación exitosa de espermatozoides humanos mantenidos a la temperatura de la nieve, Mantegazza en 1866 observó que los espermatozoides sobrevivían al enfriamiento a -17°; en el año de 1938, Jahnke escribió sobre la supervivencia de espermatozoides humanos almacenados a la temperatura del dióxido de carbono sólido. Posteriormente Rostand en 1946 utilizó material de anfibios y observó resultados favorables, a este estudio le siguió el de Polge, Smith y Parkes en 1949 en el que descubrieron las propiedades crioprotectoras del glicerol en el semen bovino (Galiana *et al.*, 2002), posterior a estos estudios Bungen y Sherman (1953) reportan los primeros nacimientos vivos luego de realizar inseminación con semen congelado de donante. Todo lo anterior abrió un campo de descubrimientos subsecuentes que formaron la base de la criobiología. (Bisioli, 2006; V;VI).

El proceso de criopreservación de semen comenzó a realizarse en los centros de reproducción asistida con el propósito de garantizar la seguridad microbiológica y virológica del semen procedente de donante (Bassas y Mata, 2001). Este procedimiento tiene como objetivo fundamental mantener el funcionamiento y viabilidad sobre los

sistemas celulares a bajas temperaturas, sin embargo, la supervivencia de las células a este proceso va a depender de numerosos factores tanto intrínsecos como extrínsecos; el obtener un protocolo ideal para la criopreservación depende de las propiedades fisicoquímicas de las células sean gametos o no (Boiso, 2001; Ávila-portillo *et al.*, 2006), por tanto es importante conocer la dinámica de formación de cristales de hielo, así como los cambios de temperatura y los cambios que se producen en las concentraciones de los solutos (Meseguer *et al.*, 2002).

Fundamentos de criopreservación

De acuerdo con Mazur (1984), los periodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial de enfriamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas. La membrana celular del espermatozoide es una capa lipídica con distribución asimétrica de proteínas en su interior; esta actúa como una barrera física, además de que interviene en el transporte de iones, macromoléculas entre otros, este complejo sistema heterogéneo está determinado por la distribución de sus componentes y el ambiente externo. La temperatura es un factor clave, ya que de ella depende tanto la velocidad o cinética de las reacciones bioquímicas, así como también que éstas tengan lugar o no (Franks *et al.*, 1981). La fluidez de los componentes de la membrana va a depender de la temperatura, y esto afecta a la permeabilidad de su estructura, incluso cuando aún no se han producido cambios de estado inducidos por la variación de temperatura. En el laboratorio se utilizan las bajas temperaturas como un medio de almacenamiento en un estado temporal de latencia de células, tejidos, órganos y organismos que no poseen esa resistencia natural a las bajas temperaturas. *Bajo estas condiciones, todas las reacciones bioquímicas, excepto algunos procesos de transferencia electrónica están detenidas* (Rublo, 2001). En el proceso de criopreservación es esencial eliminar la mayor parte del agua intracelular antes de que el congelamiento tenga lugar. En caso contrario, se formarán grandes cristales intracelulares (Lewis., 2004) que causan daño mecánico a la membrana citoplasmática y, frecuentemente, la muerte celular. El agua puede ser eliminada de las células osmóticamente, mediante curvas de enfriamiento determinadas. El proceso de congelación comienza en el espacio extracelular, con la formación de cristales de agua pura (hielo). Esto causa un aumento en la concentración (hipertonicidad) de la solución líquida extracelular restante respecto al medio intracelular, lo que perturba el equilibrio osmótico atrayendo agua intracelular al exterior, y la célula queda parcialmente deshidratada. Según

sigue disminuyendo la temperatura, más hielo extracelular se forma, más agua abandona la célula, y el grado de deshidratación celular aumenta. La solución extracelular continúa aumentando de concentración, y el punto de congelación desciende considerablemente de acuerdo con la ley física, por lo que el punto de congelación de cualquier solución desciende en 1,86 °C cuando la concentración aumenta en 1 molar. En estas condiciones de sobresaturación, la solución es capaz de seguir enfriándose sin límite (Kuntz, 1971). El efecto general de un descenso de temperatura es el enlentecimiento de todos los procesos dinámicos, como son las tasas de difusión y reacción. Este enlentecimiento es bastante independiente de la congelación en sí, pero está muy influenciada por el aumento en la concentración de la solución que tiene lugar durante el proceso (Rublo, 2001).

El mecanismo preciso para la criopreservación convencional óptima se estableció tras el estudio de los efectos producidos por diferentes protocolos de congelación y descongelación. La mayoría de las líneas celulares deben ser enfriadas lentamente, de -1 a -3°C/min., y descongeladas rápidamente para alcanzar el máximo de viabilidad. La tasa de enfriamiento (velocidad a la que disminuye la temperatura), debe ser optimizada para dar tiempo a que el agua intracelular salga al exterior de la célula, y consiguientemente, reducir la cantidad de hielo intracelular formado. En el laboratorio, el investigador controla la temperatura final y las tasas, tanto de enfriamiento como de calentamiento; y hay que tener en cuenta que la tasa máxima de calentamiento está limitada por la baja conductividad térmica del hielo. En el otro sistema de enfriamiento, con descenso brusco de temperatura (vitricación), tras la equilibración del material biológico en los medios a temperatura ambiente, estas células son sumergidas directamente en nitrógeno líquido. No hay tiempo para la deshidratación. Se fundamenta en que estos medios posean unas concentraciones tan altas de crioprotectores, que sea imposible la formación de cristales de hielo. Se produce una sobresaturación, y el paso a un estado altamente viscoso similar al vidrio (vítreo, de ahí su nombre), que sin llegar a sólido reduce el movimiento molecular casi totalmente. Esto impide la formación de cristales, lo que previene el daño causado por éstos (Dobrinisky, 1996). Todos estos procesos tienen efectos lesivos sobre el material biológico que se está criopreservando.

Los espermatozoides criopreservados exhiben modificaciones de membrana similares a las ocurridas en espermatozoides capacitados; estos eventos tienen como consecuencia la

reducción de longevidad espermática, además de una disminución notable de motilidad y actividad metabólica (Stornelli y de la Sota, 2006; Meseguer *et al.*, 2005).

Métodos de criopreservación

Existen diferentes métodos de criopreservación, en el presente texto solo se mencionan alguno de los más comunes (Meseguer *et al.*, 2002; Meseguer *et al.*, 2005).

1. Uso de pajuelas y congelación de vapores con nitrógeno (N_2); una vez cargada la pajuela con un volumen conocido de semen, previamente homogenizado con crioprotector, estas son colocadas a una distancia concreta de la superficie de nitrógeno para que los vapores congelen la muestra (figura 8).
2. Congelación con criotubos, en este método la muestra de semen homogenizada con el crioprotector se sumerge directamente en el N_2 .
3. La técnica que mejores resultados a mostrado es aquella en la que se emplean pastillas de hielo seco comprimido, de manera que tras realizar unos pequeños hoyos en la superficie del hielo, en estos se va depositando el semen con el crioprotector gota a gota, esperando un breve intervalo hasta que se congele formando píldoras individuales, de modo que luego estas son trasvasadas a otros criotubos definitivos, para posteriormente ser sumergidos definitivamente en N_2 (figura 8).

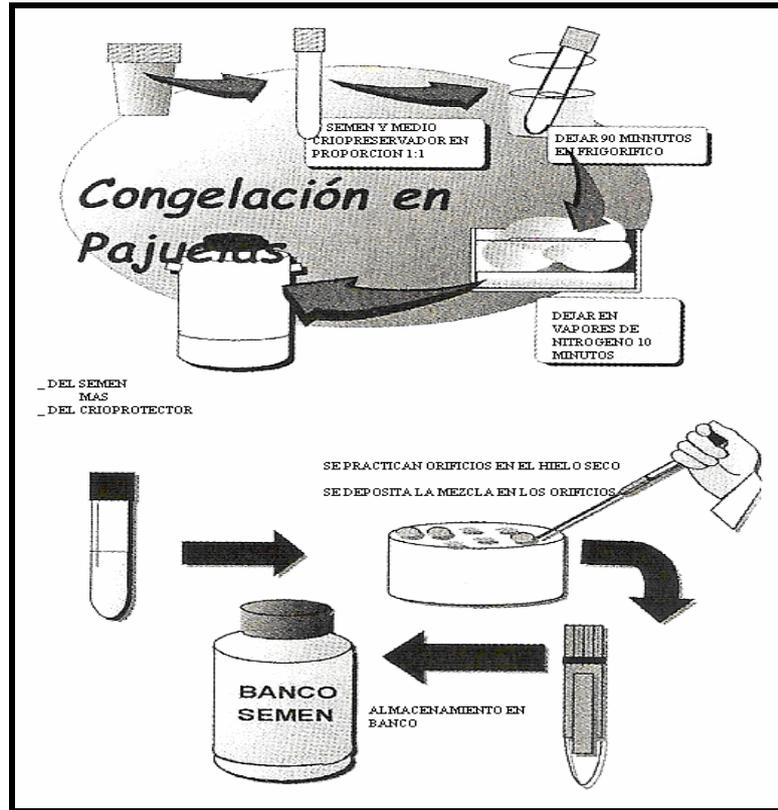


Figura 8: Representación esquemática de la congelación en pajuelas con vapores de N_2 (arriba) y de la congelación de semen en píldoras con hielo seco o nieve carbónica (abajo). Meseguer *et al.*, (2005).

Crioprotectores

Para optimizar la supervivencia celular, se añaden crioprotectores al medio de criopreservación. Son solutos orgánicos que protegen la membrana celular, núcleo y orgánulos citoplasmáticos durante el almacenamiento de larga duración en nitrógeno líquido. Son esenciales para mantener la viabilidad de la mayoría de las células criopreservadas (Rublo, 2001). Se han desarrollado crioprotectores con extensores para controlar alteraciones en los solventes y solutos intra y extracelular; así como obtener muestras con mejor calidad y mayor tiempo de almacenamiento (Góngora *et al.*, 2003). Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana celular (Boiso, 2001):

- Los agentes penetrantes tales como el Glicerol, 1, 2 Propanodiol, Etilén-Glicol son sustancias de bajo peso molecular y por ello permeables a través de la membrana,

que protegen a la célula de las lesiones producidas por la congelación a velocidad lenta.

- Los agentes crioprotectores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular entre los cuales están la sacarosa, glucosa, dextrano entre otros, son efectivos cuando se utilizan en velocidades altas de congelación, ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y por lo general se usan asociados a los agentes penetrantes.

BANCO DE SEMEN

El banco de semen es un servicio integrado en determinados centros de reproducción asistida, que permite la conservación en frío de muestras de semen y biopsias de testículos para su utilización futura. Un aspecto a considerar del banco, es el del semen de donante anónimo. El destino de este puede ser mujeres sin pareja, o parejas en las que el varón presente una patología seminal grave incluso con ausencia de espermatozoides; aquellos casos de fracaso repetido de técnicas de reproducción asistida, o de varones seropositivo para Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH); o también portadores de alteraciones genéticas todavía no tratables e identificables gracias al diagnóstico de preimplantación (Garrido *et al.*, 2005). A pesar de que la inseminación artificial se lleva a cabo desde hace más de un siglo el gran crecimiento de los bancos de semen en el mundo ocurrió en la década del '80. En el mundo solo existen cuatro bancos de semen a nivel internacional dos en Estados Unidos, uno en Dinamarca y el cuarto en España. (Gregoire y Mayer, 1965; I; II).

La indicación para la congelación del semen de donante es clara; la intención de evitar el periodo de ventana de enfermedades infecciosas como el VIH, sífilis, hepatitis que son detectados con la presencia de anticuerpos frente al virus; como son detectados en suero seis meses después del contacto con la enfermedad, las muestras de semen de un donante deben almacenarse durante ese período antes de realizar la comprobación serológica y poder utilizarlas con seguridad (Garrido *et al.*, 2005). Una de las razones por las cuales se congelan más espermatozoides que oocitos, se debe a que siempre se tiene más espermatozoides que gametos femeninos, aun en casos severos de infertilidad masculina se pueden obtener con mayor facilidad que los segundos (Bisioli, 2006).

Tanque de nitrógeno

A este recipiente criogénico también se le denomina banco de semen en el cual se mantienen tanto las muestras de donantes como de pacientes. El banco es un recipiente de tamaño variable que debe asegurar el mantenimiento de las muestras que contiene, para ello debe estar protegido por un aislante térmico, ser robusto y resistente, así, como permitir una organización interna clara, de fácil acceso y manejo de las muestras (véase figuras 9 a la 11). El tanque de almacenamiento fue diseñado para contener nitrógeno líquido, a temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, aunque aparenta ser muy fuerte, en realidad es muy frágil y debe ser manejado con mucho cuidado. Posee una doble pared que mantiene un espacio vacío aislante y un espacio interior, donde se almacenan el nitrógeno y el semen congelado a manera de botellón, cuelga por el cuello, punto más frágil del tanque, donde generalmente ocurren fracturas que conllevan a la pérdida del vacío, evaporación del nitrógeno líquido y la consecuente inutilidad del tanque (Meseguer *et al.*, 2002; VII).



Figura 9: Tanque de nitrógeno vista externa.

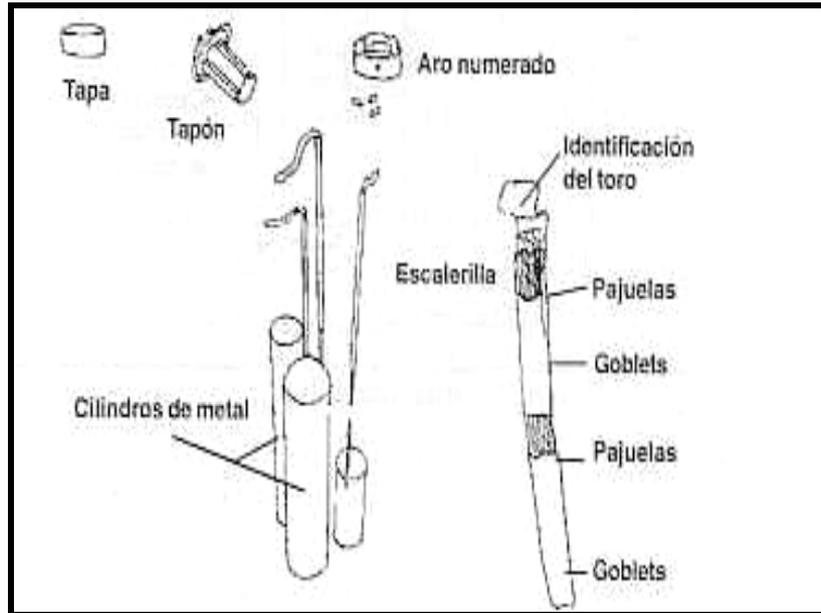


Figura 10: Elementos del tanque de nitrógeno

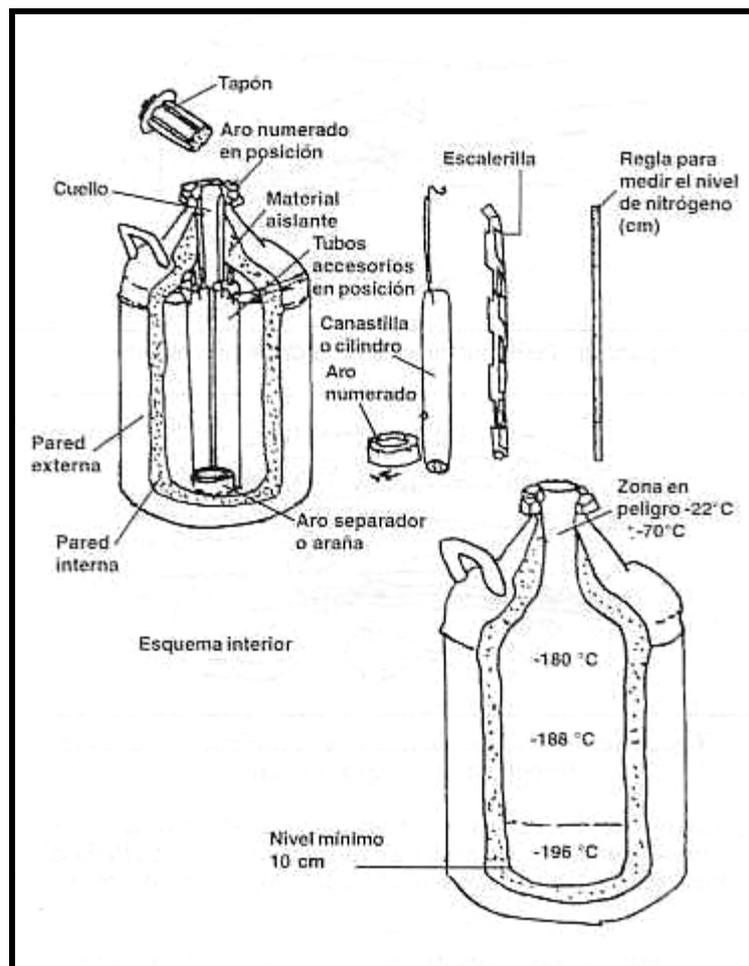


Figura 11: Tanque de nitrógeno vista interna.

Nitrógeno líquido; precauciones y propiedades físicas y químicas

En cuanto a las medidas de seguridad para el personal del laboratorio que trabaja con los bancos de semen, son aquellas que van a proteger, principalmente, del riesgo de anoxia y de quemaduras por salpicaduras o contacto. Para evitar la anoxia, es recomendable que se utilicen medidores de O₂, ya que a la presión atmosférica, cada litro de nitrógeno líquido se convierte en 680 litros de gas. Al manipular los recipientes, se produce una evaporación de N₂, y cualquier fallo de la instalación o una mala manipulación puede provocar una baja brusca de la concentración de O₂ en la sala si esta mal ventilada. Los síntomas asociados a la anoxia pueden ir desde una pérdida del conocimiento, con niveles del 18%, hasta lesiones cerebrales irreversibles, si baja del 10%, para evitarlo existen medidores de oxígeno, que controlan los niveles ambientales de O₂ (Meseguer *et al.*, 2002).

En cuanto a las quemaduras por salpicadura, el mayor riesgo se da en los ojos y en la cara, por lo que es necesario la utilización de gafas o pantallas de seguridad que los protejan. En cuanto a las quemaduras por contacto, que se producen por la manipulación de las muestras, estas se pueden evitar en gran medida con una manipulación cautelosa y con guantes de protección, aunque en ningún caso deben sumergirse las manos en el N₂. Otro aspecto que se debe mencionar es la seguridad que ofrece la congelación de material potencialmente infeccioso, como lo es el semen; los puntos a considerar son: el uso de recipientes garantizados para bajas temperaturas, el uso de recipientes secundarios, conocidos también como “doble envasado” y por último, el almacén en fase líquida frente a vapores de N₂ (Tomlinson y Sakkas, 2000).

Las propiedades físicas y químicas del nitrógeno son (Ficha de datos de seguridad, Air Liquide, 2004):

Estado físico: Líquido

Densidad relativa del gas: 0.97

Peso molecular: 28

(aire=1)

Color: Incoloro

Densidad relativa del líquido: 0.8

Olor: Inodoro

(agua:1)

Temperatura de fusión: -210 °C

Solubilidad en agua (mg/l): 20

Temperatura de ebullición: -196 °C

Temperatura crítica: -147 °C

Daños generados por la criopreservación

A pesar del éxito de la criopreservación de espermatozoides humanos, el procedimiento no está exento de riesgos y efectos perjudiciales que pueden tener lugar durante este procedimiento; como los relacionados con los cambios de temperatura (shock de frío y de calor), la toxicidad de los crioprotectores, formación y disolución de hielo en el medio ambiente extracelular e intracelular, deshidratación celular, incremento en la concentración de solutos (shock osmótico), aunado a los grandes efectos adversos sobre los parámetros generales en el seminograma, estos procesos pueden conducir a la muerte celular, desnaturalización de proteínas, daño de membrana celular, alteraciones en la estructura acrosomal; la peroxidación lipídica de la membrana (POL) también aumenta durante la criopreservación probablemente debido a un estado de estrés oxidativo inducido por el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el agotamiento de antioxidantes seminales; el estrés de los procesos de criopreservación y la generación de ROS, por lo tanto, podría dar lugar a desnaturalización y/o una mayor fragmentación del ADN de los espermatozoides. (Stornelli y de la Sota, 2006; Thomson *et al.*, 2008). La criobiología a logrado establecer procedimientos razonables para la criopreservación de semen; sin embargo este proceso de congelación-descongelación es mortal para el 45-50% de los espermatozoides, independientemente de el origen de su obtención (Bassas y Mata, 2001; Membrillo *et al.*, 2003; Quintero *et al.*, 2001) y parte de la población de espermatozoides que sobreviven han sufrido daños que los convierten en incapaces de fecundar (Stornelli *et al.*, 2001).

El daño al ADN es un fenómeno multifactorial y no del todo limitado; estudios recientes indican que el proceso de criopreservación favorece la fragmentación del ADN del gameto masculino principalmente por la generación de radicales libres de oxígeno (ROS) o estrés oxidativo que se forman durante los procesos de congelación y descongelación, sin embargo los ROS también son generados por la presencia de leucocitos, eritrocitos y espermatozoides muertos e inmaduros en la muestra a criopreservar; debido a que estos tienen un efecto perjudicial sobre las células restantes, ya que representa un daño acumulativo para los espermatozoides en almacenamiento pudiendo sufrir lesiones tanto externas como internas, así como cambios metabólicos que limitan su función biológica (Bassas y Mata, 2001; Membrillo *et al.*, 2003), también un flujo excesivo de Calcio (Ca^{2+})

al interior de la célula espermática durante el proceso inicial de criopreservación puede ocasionar fragmentación.

Daño al ADN por generación de radicales libres de oxígeno (ROS) derivados de la criopreservación

La congelación y consiguiente descongelación es una situación estresante en las que las células espermáticas a menudo sufren de manera rutinaria en las técnicas de reproducción asistida. Muchos sistemas de antiestres oxidativo se han relacionado con la peroxidación lipídica de la membrana (POL). En el semen son relevantes varias enzimas de defensa oxidativa, como la superóxido dimutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y Catalasa (CAT) (Alba *et al.*, 2000; Meseguer *et al.*, 2002). La GR tiene la función de proporcionar sustrato reducido, glutatión reducido (GSH) a la GPx para mantener su función (Meseguer *et al.*, 2002).

Funciones de los antioxidantes enzimáticos

SOD

Chihuailaf *et al.*, (2002) indicaron que esta enzima está presente en las células aerobias y fluidos extracelulares. Cárdenas y Pedraza (2006) mostraron que esta enzima es una metaloproteína, es decir que está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu-SOD y Zn-SOD contienen cobre y zinc en su sitio activo. Una de sus funciones es catalizar la dismutación de radicales libres superóxido a peróxido de hidrógeno, lo que no requiere de co sustratos, su principal función es la protección contra el anión superóxido (Venereo, 2002). La biosíntesis de esta enzima se encuentra fuertemente regulada por la concentración del sustrato sobre el cual actúa (Blokhina *et al.*, 2003).

GPx

Venereo (2002) y Blokhina *et al.*, (2003) indicaron que la enzima GPx es una selenoproteína, es decir, es una enzima selenio (Se). cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el glutatión reducido (GSH), los productos de la reacción, son el glutatión oxidado (GSSG) y el agua (Cárdenas y Pedraza, 2006). Esta enzima se encuentra en el tejido testicular y en los espermatozoides de mamíferos y funciona como una enzima que realiza un papel estructural en la cápsula

mitocondrial en la parte media y en el flagelo de los espermatozoides, cumpliendo de esta manera una función metabólica importante como antioxidante (Verma y Kanwar, 1999).

CAT

Esta enzima, cumple 2 funciones fundamentales; la primera es catalítica (Blokhina *et al.*, 2003), ya que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (proveniente de la dismutación del superóxido) en agua y oxígeno. Esta función es compartida con la enzima glutatión peroxidasa que no requiere de cofactores; segunda función, es peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante catalasa/superoxido dismutasa (CAT/SOD) que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Venereo, 2002).

GSH

Es un tripéptido que presenta una distribución tisular variable y constituye el compuesto tiólico de bajo peso molecular más abundante en las células de mamíferos. Sus propiedades químicas le permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo y especies reactivas del carbono; además, reduce el radical libre tocoferoxilo y deshidroascorbato y los reconvierte a su forma original (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004).

El equipo del instituto valenciano de infertilidad (IVI) demostró la presencia del sistema intracelular del glutatión completo y las enzimas relacionadas con su metabolismo; todo en conjunto confiere a las células espermáticas una protección potencial contra los procesos oxidativos inducidos por los radicales libres; para mantener la salud espermática y su potencial fértil después de un proceso físico estresante como la criopreservación, para lo anterior debe ser necesario un buen sistema de protección, se requiere por tanto de la adecuada presencia de GPx y GR, así como su correcto funcionamiento. La reserva de glutatión junto con la actividad de la GPx elimina radicales libres utilizando GSH (Meseguer *et al.*, 2002).

Los antioxidantes enzimáticos, catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Posteriormente, los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato (NADPH) producido en las diferentes vías metabólicas. Frente a una situación de exposición prolongada a ROS, puede ocurrir la

disminución en las concentraciones de NADPH, necesario en otros importantes procesos fisiológicos, a pesar de que algunos antioxidantes enzimáticos no consumen cofactores (Chihuilaf *et al.*, 2002).

Los ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, pero el desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide (Ball, 2002). El estrés oxidativo se define como el balance entre moléculas oxidantes y antioxidantes en un sistema biológico, favoreciendo las primeras a la presencia anormal de radicales libres (Meseguer *et al.*, 2002). De acuerdo con Hicks (2001) los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón no pareado y se comportan como moléculas altamente reactivas; pueden causar daño por reaccionar con las diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad. Los sustratos moleculares más frecuentes incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos (Machlin, 1987; Vilar-Rojas *et al.*, 1996; Beckman y Ames, 1998). Entre las especies reactivas de oxígeno más comunes se encuentran: el anión superóxido (O_2^-), el hidroxilo ($^{\cdot}OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), este último es la principal especie reactiva (Beckman y Ames, 1998; Sommer, *et al.* 2001).

La interacción del radical $^{\cdot}OH$ con el material genético modifica el ADN, pudiendo generar mutaciones y deleciones de la molécula; los ROS inducen daño a los fosfolípidos de la membrana y en el ADN de espermatozoides humanos (figura 12). La producción de ROS y el daño al ADN son mayores en los espermatozoides inmaduros con retención de citoplasma y anomalías morfológicas en la cabeza. La peroxidación lipídica asociada a ROS provoca la disminución de la movilidad, viabilidad espermática, integridad acrosomal y del potencial de membrana mitocondrial (Al-abdull y Lee 1998; Ollero *et al.*, 2001; Baumber *et al.*, 2000). En espermatozoides humanos, el H_2O_2 causa una elevada fragmentación de ADN, además de reducir su movilidad y capacidad de fusión con los ovocitos (Aitken *et al.*, 1998).

Se han propuesto una gran variedad de marcadores biológicos para medir el estrés oxidativo, cuyos indicadores se han desarrollado para determinar el daño mediado por radicales libres, dentro de los cuales se incluyen las mediciones de lípidos, proteínas y ADN oxidados, no obstante el estrés se puede estudiar indirectamente mediante la

determinación de la concentración o actividad de los agentes antioxidantes circulantes, tales como proteínas, vitaminas, minerales y enzimas (Sánchez *et al.*, 2004).

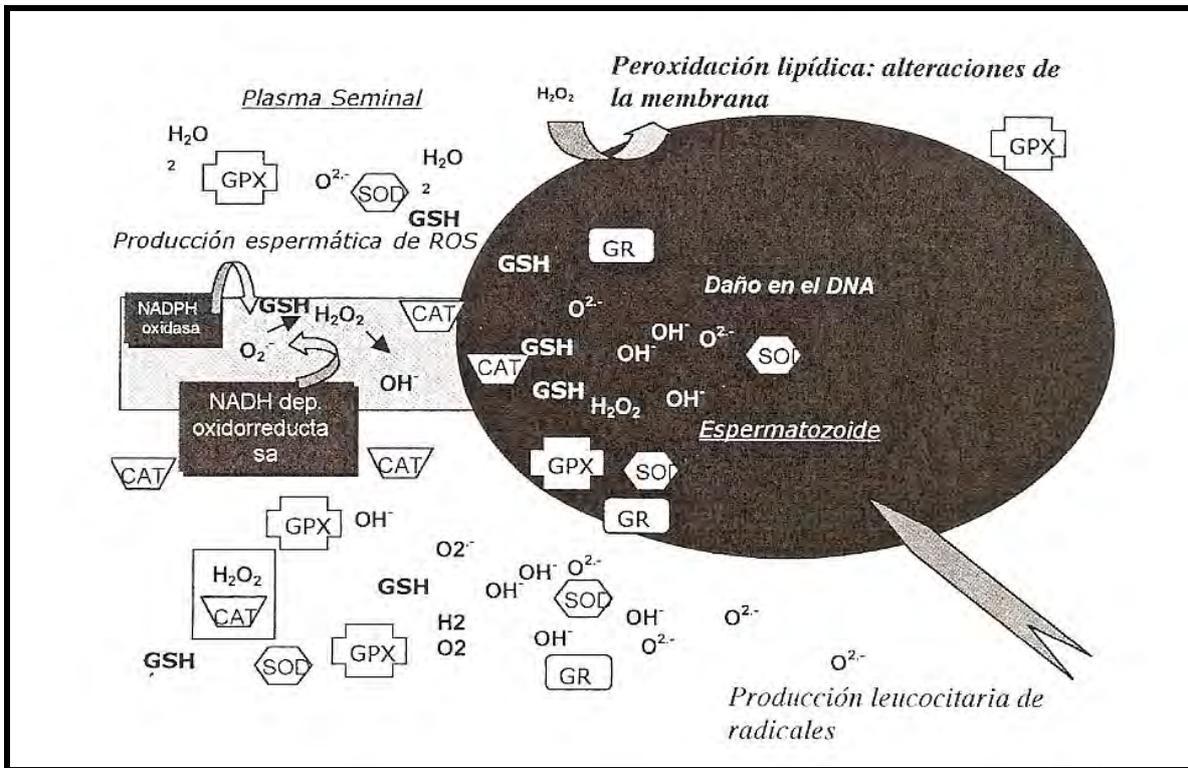


Figura 12: Esquema del metabolismo del estrés oxidativo en el espermatozoide (Meseguer *et al.*, 2005). SOD: superóxido dimutasa, GPx: glutatión peroxidasa, CAT: catalasa, GSH: glutatión reducido, $O_2^{\cdot-}$: anión superóxido, OH^{\cdot} : radical hidroxilo, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno

Los radicales libres también tienen importantes funciones 1) fisiológicas en el organismo como la de participar en la fagocitosis, 2) favorecer la síntesis de colágeno, la de prostaglandinas, activar enzimas de la membrana celular, disminuir la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modificar la biomembrana y favorecer la quimiotaxis; en este sentido los radicales libres se deben considerar que son benéficos o tóxicos, dependiendo de su concentración y de los mecanismos antioxidantes que los produzcan (Venereo, 2002 ; Hicks *et al.*, 2006).

Daño el ADN por flujo excesivo de Calcio (Ca^{2+}) al interior del espermatozoide por enfriamiento inicial.

La disminución de la temperatura del medio aumenta el flujo de Ca^{2+} , efecto que se incrementa si el enfriamiento es rápido (como es habitual en los procedimientos de reproducción asistida). El calcio intracelular es otro de los segundos mensajeros que

parecen mediar los procesos de apoptosis y envejecimiento celular en los que se produce una fragmentación de ADN. El incremento del Ca^{2+} en el citosol puede ser deberse a una entrada extracelular o a la liberación de los depósitos intracelulares. El Ca^{2+} puede participar de una forma directa en la fragmentación del ADN ya que actuaría como cofactor de determinadas endonucleasas que son enzimas capaces de fragmentar el ADN (Roche y Romero-Alvira, 1996).

Determinación de fragmentación de ADN espermático

De los diversos parámetros que se estudian para determinar la calidad espermática existe uno que llama la atención en los últimos años: la Fragmentación de la molécula de ADN en los Gametos masculinos. Este parámetro es de gran relevancia debido a que la transferencia de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al óvulo, es esencial para conseguir la gestación de un individuo normal (Gosálvez *et al.*, 2007)

Las técnicas que existen para estudiar la fragmentación del ADN espermático se dividen en dos grupos. En primer lugar se encuentran aquellas que marcan las roturas en la cadena de ADN, porque incorporan moléculas marcadas con fluorocromos en los extremos de rotura. Y en el segundo grupo se encuentran aquellas que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos. En este grupo se encuentran las siguientes (Morales *et al.*, 2007).

Análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide (SCSA)

La técnica SCSA (sperm chromatin structure assay) se basa en el principio de que la cromatina anormal presenta una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente. El grado de desnaturalización resultante como consecuencia de su tratamiento mediante calor o con ácido se determina midiendo el cambio metacromático del colorante naranja de acridina (*acridine orange* "AO") de fluorescencia verde (AO intercalado) a una fluorescencia roja (AO sin intercalar). Los resultados se expresan como el índice de fragmentación de ADN (DFI). Dado que los resultados del SCSA son más constantes en períodos prolongados que los parámetros de la Organización mundial de la salud (OMS), esta técnica resulta apropiada en estudios epidemiológicos de la esterilidad masculina. El SCSA se ha usado para predecir la capacidad de fertilización, implantación y embarazo tras las TRA. Los resultados de SCSA también se han correlacionado con la fertilidad *in vivo* (Evenson y Wixon, 2006).

DBD-FISH. Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization

Es un método relativamente reciente basado en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas o bien ácidas suaves, de producir desnaturalización en la molécula de ADN utilizando los extremos generados por roturas en las cadenas. Esta técnica también detecta aquellos lugares sensibles al álcali, por lo tanto es conveniente establecer los niveles de base de estos lugares presentes en los genomas a analizar, ya que estos son propios de cada especie. Básicamente la metodología requiere una desnaturalización de la molécula de ADN y una extracción proteica, para ello se utiliza una solución de lisis. La desnaturalización se produce a partir de los extremos de la rotura, se generan tramos restringidos de ADN de cadena sencilla que son susceptibles de hibridar con una sonda de ADN marcada con un fluorocromo. Cuantas más roturas existan en la cadena de ADN, mayor será el nivel de marcado que se obtenga en el núcleo (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

Test de dispersión de cromatina (SCD)

La idea base del test SCD reside en producir una descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto. Para ello se actúa directamente con un tratamiento de desproteización y de esta forma se facilita la relajación de la cromatina. En el caso de las muestras de esperma humano, los diferentes protocolos ensayados muestran que, después de un tratamiento ácido previo a una posterior desproteización, los espermatozoides que presentan el ADN fragmentado no liberan bucles de ADN y no generan un halo de dispersión de la cromatina o si lo hacen este es de pequeño tamaño. Por el contrario, los espermatozoides sin fragmentación de su ADN generan halos amplios de dispersión de los bucles de cromatina, que se diferencian morfológicamente de los anteriores (Fernández *et al.*, 2003).

Ensayo cometa

El ensayo cometa, también conocido como electroforesis de células únicas para el análisis del ADN de una sola célula, fue introducido por primera vez por Ostling y Johanson en 1984 y fue modificado posteriormente en 1988. Cuando se descondensa el ADN del espermatozoide en el seno de un gel y se somete a la acción de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se desplazan y generan una imagen en forma de cometa (de ahí el nombre de ensayo cometa). La presencia de daño en el ADN se cuantifica midiendo la

longitud de la cola. A su vez pueden utilizarse también otros parámetros de medida, tales como el “momento de la cola”, que es el producto de la longitud de la cola por su intensidad (fracción del total del ADN de la cola) (Agarwal y Allamaneni, 2005).

En el segundo grupo se encuentran:

Ensayo TUNEL

El ensayo TUNEL (Terminal deoxinucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End Labeling) es uno de los más utilizados para medir las anomalías del ADN. En varios estudios se ha demostrado una correlación inversa entre el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado y la movilidad, la concentración y la morfología del eyaculado. En diversos estudios que han utilizado este ensayo TUNEL se ha abordado su utilidad como predictor del éxito en las técnicas de reproducción asistida. El ensayo TUNEL se basa en el principio de que la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) incorpora dUTP en roturas de cadenas dobles o simples del ADN. En concreto, en el ensayo se incorpora desoxiuridina biotinilada al 3'OH del ADN. La biotina actúa como señal y puede ser detectada fácilmente, por ejemplo, a través de técnicas fluorescentes. Cuantas más roturas tenga el ADN mayor será la señal resultante. En los espermatozoides con ADN normal sólo se detecta fluorescencia de fondo, mientras que los espermatozoides con ADN fragmentado (múltiples 3'-OH terminales) se tiñen con una fluorescencia intensa. La fluorescencia puede detectarse tanto por citometría de flujo como a través de microscopía fluorescente (Evenson y Dixon, 2006).

Ensayo *in situ* nick translation

El análisis de *in situ* nick translation (NT) cuantifica la incorporación dUTP (desoxiuridin trifosfato) biotinilado a las roturas del ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por la polimerasa I. El ensayo NT detecta los espermatozoides que contienen valores apreciables de daño endógeno en su ADN. Los resultados del análisis de NT indican la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide. El estudio de la integridad nuclear espermática mediante el análisis NT evidencia una buena correlación con la movilidad y la morfología espermática, y en menor medida con la concentración de espermatozoides en el semen. Los resultados del análisis de NT muestran una correlación muy buena con la sensibilidad de CMA₃ y el análisis TUNEL ($r = 0,86$; $p < 0,05$ y $r = 0,87$; $p < 0,05$, respectivamente). También se ha

utilizado el análisis de NT para demostrar la presencia de daño en el ADN debido a la presencia de radicales libres originados por la presencia de leucocitos en el tracto reproductor masculino (Agarwal y Allamaneni, 2005).

A continuación se muestra un resumen de las metodologías utilizadas para evaluar alteraciones en el DNA de espermatozoides, así como de algunas de sus ventajas e inconvenientes en relación con la aplicación clínica de rutina (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007):

Metodologías que se basan en el marcaje de roturas del DNA				
Método	Instrumental	Ventajas	Desventajas	Utilidad clínica
TUNEL	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Cumple con parámetros de control de calidad	Equipo sofisticado y costoso	Fertilidad masculina Reproducción asistida Pérdidas fetales
ISNT	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Reacción de marcaje directo	Equipo sofisticado y costoso	Fertilidad masculina
Metodologías que se basan en la susceptibilidad del DNA para desnaturalizarse				
SCSA	Citometría de flujo	Punto de corte establecido (30%) para diferenciar pacientes fértiles e infértiles	Instrumentación costosa Capacitación técnica	Recomendada en estudios epidemiológicos de infertilidad
COMETA	Microscopio Fluorescencia Electroforésis DNA	Bajo costo	Lento de ejecución Requiere observador con experiencia	Fertilidad masculina Reproducción asistida Criopreservación de esperma
SCD	Microscopio Fluorescencia campo claro	Análisis simple de resultados Bajo costo	Aún no determinada	Aún no determinada Variocele?
DBD-FISH	Microscopio Fluorescencia	Revela modificaciones estructurales de la cromatina.	Procedimiento sofisticado y costoso	Aún no determinada
Otros métodos				
NA	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Diferencias significativas en patologías andrológicas
AT	Microscopio campo claro	Método simple y de bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Evaluación de anomalías en la cromatina.
CMA	Microscopio Fluorescencia	Método simple y de bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Evaluación de anomalías en la cromatina.

TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labeling, ISNT = In situ Nick Translation, DBD-FISH: DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization, SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay, SCD: Sperm Chromatin Dispersion, NA: Naranja de Acridina, AT= Azul de Toluidina, CMA: Cromomicina A3.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad un gran número de parejas en el mundo presentan problemas de fertilidad, en México la cifra es de una por cada seis parejas, aproximadamente en el 50% de los casos el problema esta relacionado con el factor masculino, que es diagnosticado habitualmente por los resultados anormales en el seminograma, debido a lo anterior muchas veces se opta por recurrir a muestras de banco de semen de clínicas especializadas en infertilidad, sin embargo, estas muestras de semen a pesar de ser consideradas como de buena calidad pueden sufrir lesiones en su ADN debido al proceso de criopreservación el cual supone debería conservarlas en el mejor estado posible hasta el momento de su uso causando fragmentación del material genético, estos espermatozoides con su ADN fragmentado pueden provocar resultados negativos en las TRA debido a que en este tipo de técnicas se eliminan gran parte de las barreras naturales, por lo cual un esperma con su material genético dañado podría fecundar un oocito con el mínimo esfuerzo causando fallos de implantación, desarrollo embrionario anómalo, perdidas tempranas de embarazo y de acuerdo con diversos autores pudiendo provocar desde la propia infertilidad del nuevo individuo, hasta estar relacionado con canceres infantiles en caso de que el daño al ADN sea compatible con la vida. Todo ello obliga a intentar utilizar espermatozoides con el ADN íntegro basándose en su morfología y movimiento, pero cabe destacar que estas dos características mencionadas no son garantía de una buena integridad genética del espermatozoide.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el estudio de los niveles de fragmentación del material genético de los espermatozoides se ha convertido en un tema de gran relevancia. Su correcta determinación no sólo proporciona información trascendental en el campo estricto de la fertilidad, sino también en el caso de muchas patologías andrológicas como el varicocele, infecciones, cáncer, exposición a genotóxicos, situaciones de estrés etc. Desde este punto de vista, el análisis de la fragmentación del ADN debería ser un parámetro adicional en la evaluación de la calidad seminal y complementario a aquellos que son habituales en un seminograma. La fragmentación de ADN se considera un fenómeno multifactorial tanto de causas intrínsecas como extrínsecas al varón, sin embargo, en años recientes se ha demostrado que el proceso de congelación-descongelación de los espermatozoides en las técnicas de reproducción asistidas produce incrementos en los niveles de fragmentación del material genético de las células espermáticas, por lo tanto el presente trabajo pretende demostrar si hay un aumento en la fragmentación tras el proceso de criopreservación en comparación con la fragmentación de ADN valorada en semen fresco.

HIPÓTESIS

Si en el proceso de congelación-descongelación del semen afecta la integridad de la molécula del ADN del espermatozoide, por lo tanto deberá existir diferencia entre los niveles de fragmentación del ADN antes y después de dicho proceso.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar mediante el test de dispersión de cromatina (SCD) el grado de fragmentación de ADN en los espermatozoides después del proceso de postcongelación y en semen en fresco en muestras de buena calidad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer alguna relación entre los parámetros normales del semen como concentración, morfología y movilidad con respecto al índice de fragmentación de ADN.
- Determinar si la tasa de embarazo presenta relación con el índice de fragmentación de ADN en muestra de semen descongelado utilizado en las técnicas de reproducción asistida.
- Establecer si la técnica de congelación-descongelación utilizada en este trabajo cambia el índice de fragmentación de ADN. En muestras de donante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de donadores

Se emplearon 40 muestras de semen de donante, del instituto de infertilidad y genética. Los criterios de selección de los donantes son, por un lado, propios de cada centro de reproducción, que establecerá los límites mismos de calidad seminal y las características psicológicas aceptables en estos casos (Meseguer *et al.*, 2002).

Criterios para selección de donantes en el Instituto de Infertilidad y Genética (INGENES).

Los candidatos son debidamente informados de las pruebas a las que van a ser sometidos, así como la frecuencia con la que tendrán que asistir al banco y la necesidad de controles serológicos adecuados. Se les recalca la necesidad periódica de abstinencia sexual de tres a cinco días previos a la realización del análisis, así como el modo de recoger la muestra (Meseguer *et al.*, 2002).

- ❖ Menor de 35 años.
- ❖ Cariotipo normal.
- ❖ Evaluación física y psicológica por un profesional.
- ❖ Historial familiar y sexual.
- ❖ La muestra para ser valida debe presentar un mínimo de espermatozoides móviles progresivos en fresco totales a los 80 millones.
- ❖ Se les realizan pruebas de congelación-descongelación, para superar esta prueba el semen debe de recuperar aproximadamente el 50% de los espermatozoides móviles progresivos.
- ❖ Deben de sobrevivir el 50% de los espermatozoides al proceso de descongelación.
- ❖ Negativo para VIH.
- ❖ Negativo para Hepatitis B y C.
- ❖ Negativo para Sífilis.

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación, en recipientes estériles de plástico, debidamente etiquetados con los datos del donante, una vez obtenida la muestra se colocó en baño María por 30 min a 37° C para su licuefacción y se procedió a la realización del seminograma.

Análisis macroscópico

Aspecto

Un eyaculo normal debe tener un color opalescente. Un color pardo del eyaculado debe hacer pensar en una *hemospermia* y puede incluso que aparezca sangre en la orina. No debe presentar cuerpos gelatinosos o grumos (WHO, 1999).

Volumen

Debe medirse con una pipeta graduada. Las jeringas de plástico no deben utilizarse por que pueden afectar la movilidad espermática y las agujas no son seguras. (Molla *et al.*, 2005).

pH

El pH de la muestra licuada se mide con tiras de papel pH como la ColorpHast de Merck (Dermstadt, Alemania). Se pone sobre la tira de papel una gota de semen, al cabo de 30 segundos el color de la zona debe ser uniforme y se compara con la tira de calibración (Molla *et al.*, 2005).

Análisis microscópico

Concentración

Se utilizó la cámara Mackler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel). Esta cámara consta de una cuadrícula de 1mm^2 dividida en 100 cuadros, con una profundidad de $10\mu\text{L}$. Se contaron los espermias presentes en 3 columnas o filas de la cámara se sumaron, posteriormente el resultado se multiplica por 10 y se divide entre 3 (Molla *et al.*, 2005).

Movilidad

Este parámetro también se tomó en la cámara mackler, se contaron 200 espermatozoides, de igual modo que en la concentración contando por filas o columnas al azar, pero procurando evitar aquellas células que muestran aglutinación entre ellas, el conteo de estas células se llevo a cabo por medio de un contador electrónico.

El tipo de movimiento de los espermatozoides se catalogó de la siguiente manera (Molla *et al.*, 2005):

- Móviles progresivos rápidos: Desplazamiento de forma rectilínea y rápida (Tipo A).
- Móviles progresivos lentos: Desplazamiento de forma más lenta y de manera rectilínea o en curva (Tipo B).
- Móviles no progresivos: Se mueven pero no avanzan (Tipo C).
- Inmóviles: No se mueven (Tipo D).

Morfología espermática

La extensión se realizó con 3 a 5 μ l de la muestra sobre un portaobjeto, se dejó secar durante 5 min, posteriormente para la tinción se utilizó el kit de Diff Quikc catalogo # B4132-1A DADE BEHRING, de la siguiente manera: se sumergió la laminilla en la solución fijadora (alcohol) durante 5 min, enseguida se introdujo en la solución de eosina durante 5 veces seguidas y por último se repitió este paso pero en la solución de azufre. Se dejó secar a temperatura ambiente y se procedió a su observación en microscopio de campo claro a 100 X, con ayuda de aceite de inmersión. La morfología se leyó catalogando las anomalías presentes en la cabeza, cuello y cola del espermatozoide, así como también aquellos que presentaban una morfología excelente, el conteo fue de 200 espermatozoides; aplicando estricto criterio de Kruger; criterio más rígido para interpretar la morfología que el de la Organización mundial de la salud (OMS) que postula que una muestra normal contendría considerablemente menos de un 60% de formas normales (Molla *et al.*, 2005).

Material para criopreservación (Irvine Scientific®)

- Tubos criovial.
- Escalerillas.
- Freezing médium.
- Pipetador y pipetas desechables.
- Una caja de unicel.
- N₂ líquido.
- Muestras de semen de donante

Protocolo de congelación de muestras de semen (Irvine Scientific®)

Preparación de la muestra

- 1) Tras la colecta, se espero durante 20-30 minutos hasta su completa licuefacción y se realizo el análisis básico de la misma (concentración, movilidad, morfología etc).
- 2) Una vez que se realizo este examen, se separaron 30 µl del resto de la muestra para evaluar el nivel de fragmentación en fresco.
- 3) Posteriormente el resto de la muestra se colocó en un tubo criovial y se procedió a la adición del crioprotector.

Adición de crioprotector

- 1) El crioprotector se añadió (Freezing medium; Irving Scientific®. Catalogo # 90128, contiene: TES, Tri citrato sódico y fructosa. Sulfato de gentamicina, concentración de 10 microgramos por ml, glicerol, concentración 2% v/v, yema de huevo inactivada por calor, obtenida de huevos de animales libres de patógenos (SPF) o_specific pathogen free 20%).
- 2) Previamente atemperado, en proporción 1:1 v/v. La adición del crioprotector fue muy cuidadosa y se realizo muy lentamente gota a gota mezclándolo con la muestra con ayuda del pipetador de manera que se evite un choque osmótico a las células espermáticas.
- 3) La adición del crioprotector se realizó en un tiempo no mayor a 10 min. Una vez realizado este paso se procedió inmediatamente a la criopreservación. El tubo en el cual se mezcló el semen con el crioprotector fue debidamente rotulado.

Proceso de criopreservación

- 1) En un recipiente de unicel se colocó el nitrógeno líquido necesario (hasta que la superficie del nitrógeno quedo a 10 cm de distancia de los tubos criovial), se suspendieron los tubos criovial con ayuda de una escalerilla en vapores de N₂ por 15 minutos y posteriormente se sumergieron directamente en N₂ por 20min.
- 2) Por último los tubos criovial fueron pasados al tanque de almacenamiento de las muestras durante 24 hrs. Después de ese tiempo fueron descongeladas y se les realizo la evaluación de fragmentación postcongelación.

Protocolo de descongelación de muestras de semen (Irvine Scientific®)

- 1) La(s) muestra(s) se sacaron del banco de semen, se dejaron atemperar o se colocaron en una incubadora con agua a una temperatura de 37° C por 10 minutos. Cuando las muestras estuvieron completamente descongeladas y aclimatadas, se procede a su utilización.

Para la realización de este estudio se empleó la técnica SCD (Sperm Chromatin Dispersion), con el kit de halosperm® kit to Assess Sperm DNA Fragmentation in human. halotech® DNA. LABORATORIOS INDAS, S.A. Catalogo # HT-HS1.

El test SCD esta basado en el principio de que el espermatozoide con ADN fragmentado no produce el halo de dispersión característico de ADN que es observado en espermatozoides que no tienen su ADN fragmentado, después de la desnaturalización ácida y la remoción de proteínas nucleares (figura 13) (Fernández *et al.*, 2003). Calvin y Bedford reportaron el papel que juegan los puentes disulfuro en la compactación de la cromatina de los espermatozoides y las diferencias que existen con respecto a la línea somática, este ADN se encuentra organizado en bucles de menor tamaño que los de las células somáticas, anclados a la matriz nuclear. Dichos bucles se compactan por la acción de las protaminas intercaladas, las cuales estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas. Si se rompen los enlaces disulfuro y se usa una solución específica de lisis para extraer proteínas, los bucles de ADN se relajan constituyendo halos alrededor de la estructura nuclear central residual. Simplemente valorando el tamaño de los halos de dispersión de cromatina, mediante microscopia de campo claro como de fluorescencia, es posible reconocer la presencia de fragmentación de ADN en los espermatozoides humanos (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

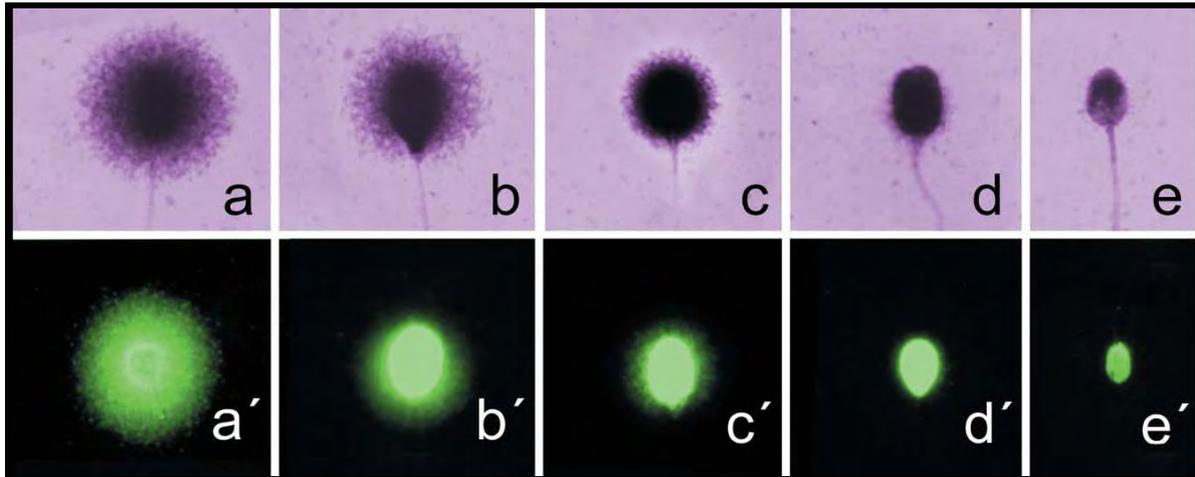


Figura 13: Visualización de la integridad del ADN mediante el test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) y visualización en microscopía de campo claro (a-e; tinción: colorante de Wright) y microscopía de fluorescencia (a'-e': tinción SYBR-Green). Mientras que los espermatozoides etiquetados como a y b, tienen su ADN integro, el resto presentan ADN fragmentado (Cortés-Gutiérrez, 2007).

Protocolo de fragmentación de ADN mediante el test SCD (Halosperm®)

Material para fragmentación de ADN

- Microscopio de campo claro o fluorescencia.
- (Recomendable objetivo de inmersión)
- Nevera a 4°C.
- Baño de incubación a 37°C.
- Guantes de plástico.
- Cubreobjetos de cristal (18x18 o mm, 22x22 mm).
- Micropipetas.
- Cajas para incubaciones en horizontal.
- Agua destilada
- Etanol 70%, 90%, 100

Protocolo para la realización del SCD (Halosperm®)

Inclusión de la muestra en microgel de agarosa

- 1) El frasco de la solución de lisis se dejó a temperatura ambiente para que alcanzara los 22 °C.
- 2) La muestra(s) de semen diluyeron en medio HTF Hepes, No. de catalogo: 90126, en una concentración de 5-10 millones por mililitro. Se pueden utilizar tanto muestras frescas como congeladas directamente en nitrógeno líquido.
- 3) El tubo eppendorf con agarosa se introdujo con el flotador, se colocó al nivel de la tapa, y se dejó flotar 5 minutos en agua a 90-100°C, hasta que la agarosa se disolvió.
- 4) Se transfirió el tubo eppendorf con el flotador, a un baño maría a 37°C, y se dejó 5 minutos hasta que se equilibro la temperatura.
- 5) Se añadieron 25 microlitros de la muestra de semen al contenido del tubo eppendorf y se resuspendió.
- 6) Un portaobjetos pretratado fue colocado en una superficie fría, a 4°C (por ejemplo, una lámina metálica o de vidrio).
- 7) Una vez enfriado el portaobjetos, se depositó la suspensión celular del tubo eppendorf sobre la cara tratada del portaobjetos, y se colocó un cubreobjetos, evitando formar burbujas de aire. Se depositó una gota de 20 microlitros, para un cubreobjetos 22x22mm. A lo largo de todo este proceso, el portaobjetos se mantuvo en posición horizontal.
- 8) La lámina fría se introdujo con el portaobjetos, en la nevera y se dejó gelificar la muestra durante 5 minutos.

Procesado de la muestra

- 9) Se preparó la solución desnaturalizante mientras se gelificaba la muestra. Para ello, se añadieron 80 microlitros del contenido del frasco de la solución desnaturalizante en 10 mililitros de agua destilada, se mezcló y se depositó en una caja de incubación.
- 10) El cubreobjetos fue retirado deslizando con suavidad, se introdujo inmediatamente el portaobjetos en posición horizontal en la solución desnaturalizante y se dejó incubando durante 7 minutos, a temperatura ambiente (22 °C).

- 11) El portaobjetos fue llevado con ayuda de una lanceta, usando guantes. Sujetándolo de modo horizontal, y se depositó también en horizontal, en una caja de incubación que contenía 10 ml de solución de lisis (atemperada). Se incubó durante 25 minutos.
- 12) El portaobjetos fue levantado y se introdujo de modo horizontal en una caja conteniendo abundante agua destilada para lavar la solución de lisis. Dejándolo que se incubó durante 5 minutos.
- 13) El portaobjetos se introdujo en forma horizontal, en una caja con etanol 70% (2 minutos), luego en etanol 90% (2 minutos), y finalmente en etanol 100% (2 minutos).
- 14) Por último se dejó secar al aire.

Tinción de la muestra

La tinción se llevó a cabo antes de proceder a la visualización y análisis.

Tinción para observación en microscopio de campo claro

Se usó la tinción de Diff Quikc con una pequeña variación, debido a que de este modo se han observado mejores resultados para la lectura en microscopio de campo claro.

1. No se utilizó la solución fijadora.
2. Se incubaron horizontalmente los portaobjetos en la solución de eosina durante 6 min.
3. Enseguida se incubaron los portaobjetos en la solución de azufre durante 6 minutos, se esperó a que la muestra estuviera seca y se procedió a la observación en objetivo de 100x.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Espermatozoides sin fragmentación de ADN (figura 14):

- 1) Espermas con gran halo: estos presentan un halo ancho, similar o tan grande como el diámetro menor de la cabeza.
- 2) Espermas con halo mediano: el tamaño de este halo está entre un halo grande y uno pequeño.

Espermas con ADN fragmentado:

- 3) Esperma con halo pequeño: el ancho del halo es similar o tan pequeño una tercera parte del menor diámetro de la cabeza.
- 4) Espermas sin halo: no presentan halo.
- 5) Espermas sin halo o degradados: estos no muestran halo y presentan una cabeza irregularmente desteñida.

Otros:

- 6) Los núcleos celulares que no corresponden a los espermatozoides. Características morfológicas; tales como la ausencia de cola.

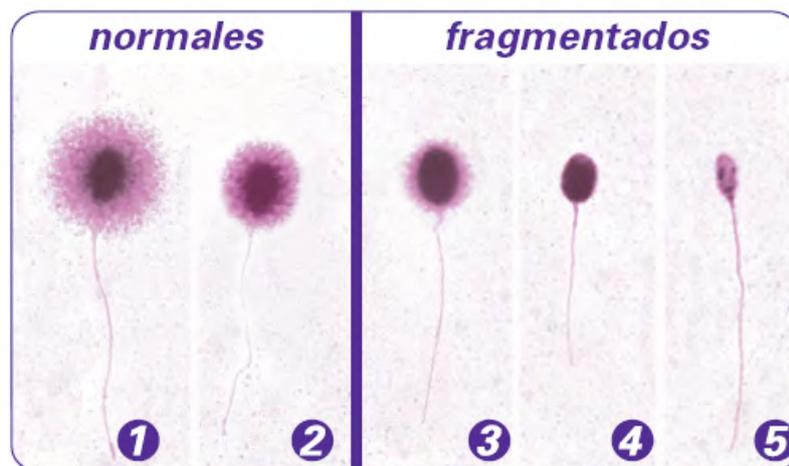


Figura 14: interpretación de resultados (Halosperm®)

Se realizara un conteo de 500 espermatozoides, registrando en porcentaje el número de espermatozoides con ADN fragmentado.

Tabla de categoría de índice de fragmentación (Evenson *et al.*, 2002).

- excelente si DFI < 15%
- bueno DFI 15-24%
- malo DFI 25-30%
- muy malo DFI > 30%.

Cada una de las muestras se utilizó en diversas técnicas de reproducción, estas fueron almacenadas hasta su utilización.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados por medio de las prueba de Kruskal-Wallis para determinar la normalidad de los datos, de Tukey para determinar diferencia de medias, Anova para establecer si alguna de las medias es diferente, t-Student de comparación de medias de datos pareados y Regresión simple, se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.1. Se consideran como significativas las relaciones que fueron igual o menor a 0.05.

RESULTADOS

Se procesaron un total de 40 muestras de semen de donante, a las cuales se les realizó seminograma y el test de dispersión de cromatina, de acuerdo al porcentaje obtenido en esta prueba fueron catalogados con un DFI: excelente, bueno y malo.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos del DFI en fresco y postdescongelación, observándose un aumento en la fragmentación después de la descongelación, en los grupos de calidad excelente y bueno.

Tabla: 1. Fragmentación de ADN pre y postcongelación

% DFI	EXCELENTE < 15%	BUENO 15-24%	MALO 25-30%
No. Donantes	23	14	3
Precongelación	9.82	19.11	29.46
Postcongelación	15.74	22.28	33.13
P value	0.00000293635	0.0287206	0.378239

Se presenta el incremento de la fragmentación de ADN de las muestras de semen en precongelación y su aumento postdescongelación.

De los parámetros seminales en la tabla 2, sólo se encontró diferencia estadística en la morfología para los grupos de calidad excelente y mala. No se encuentra diferencia significativa para los parámetros de movilidad en fresco, movilidad postdescongelación y concentración.

Tabla 2. Parámetros seminales obtenidos por calidad del DFI

PARAMETROS SEMINALES	EXCELENTE < 15%	BUENO 15-24%	MALO 25-30%	P VALUE
Concentración Millones/ml	154.62	124.33	122.99	N/S
% Morfología	5.65	5.14	2.33	Diferencia significativa entre calidad Excelente y Malo P=0.0266
% Movilidad A+B en fresco	68.86	63.35	56	N/S
% Movilidad A+B postdescongelación	44	42.5	32.66	N/S

Los parámetros de concentración y morfología fueron tomados únicamente en fresco, debido a que estos no cambian tras la postdescongelación, a diferencia de la movilidad que si presenta cambios después de este proceso, perdiendo la movilidad del 40 al 60% de muestra.

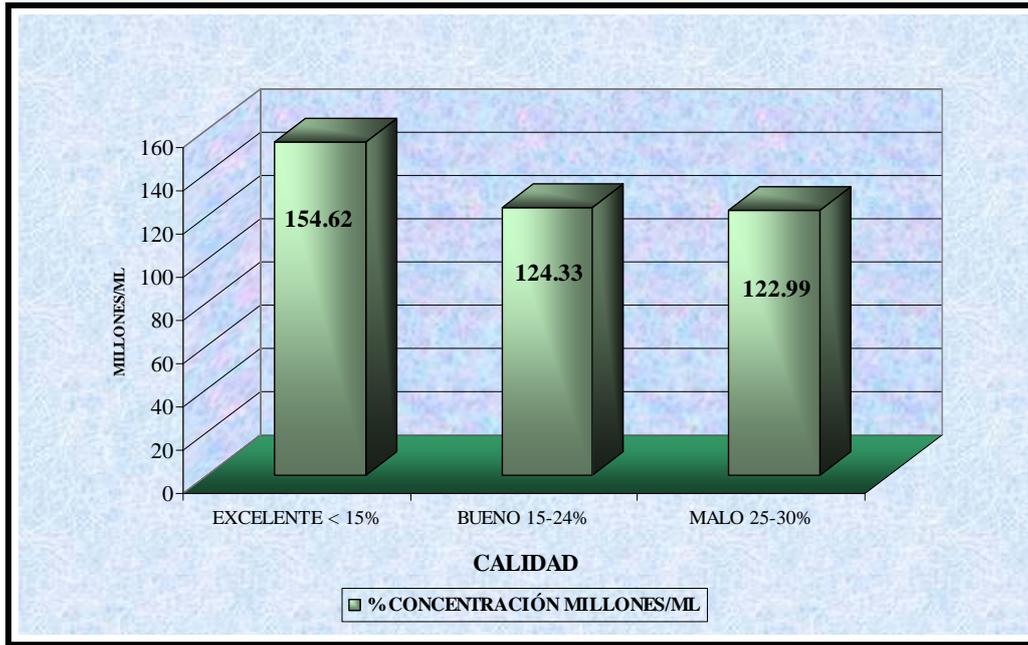


Figura 15: En esta grafica se muestran las diferencias en la concertación de los tres grupos, siendo muy similares entre calidad bueno y malo, sin embargo el análisis estadístico demostró que no existe diferencia significativa entre las 3 calidades con una $p = 0.2791$. Ver anexo.

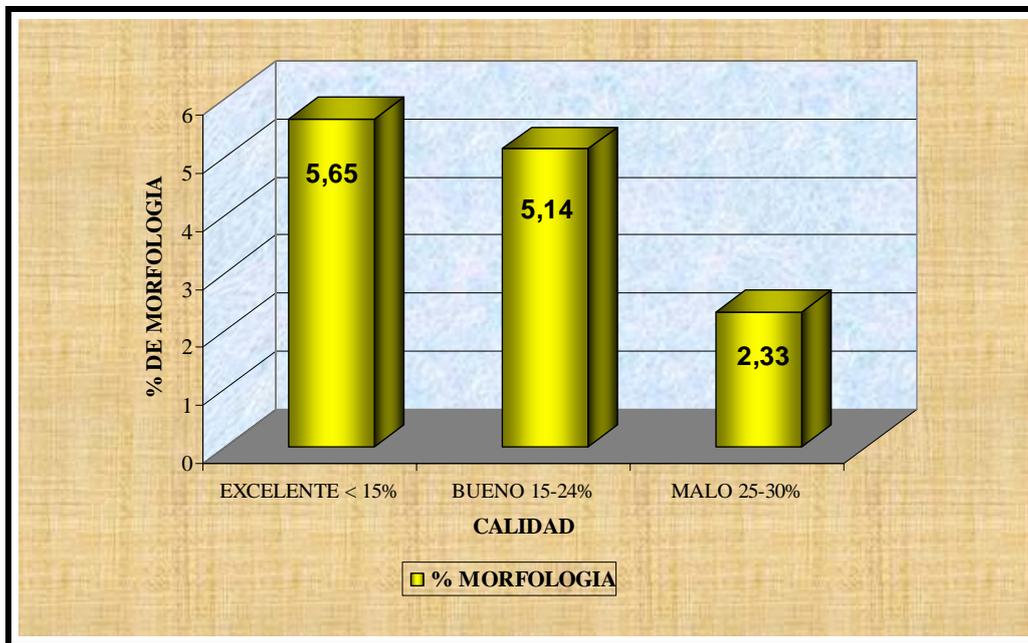
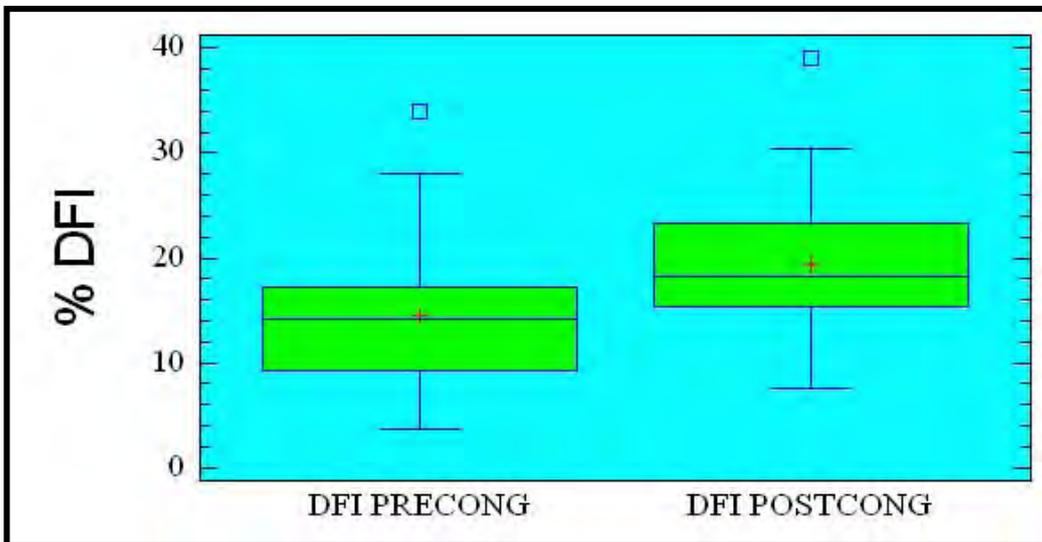


Figura 16: Morfología espermática en fresco, solo se presento diferencia significativa entre los grupos con fragmentación de ADN excelente y malo con una $p= 0.0266$, los valores de morfología en grupos de excelente y bueno no presentaron relevancia significativa. Se debe mencionar que la morfología no cambia después del proceso de criopreservación debido a ello esta solo fue medida en fresco. Ver anexo.

De acuerdo con el análisis multivariable los parámetros seminales de concentración, movilidad en fresco y descongelado no están relacionados con el DFI, solo se presentó una relación significativa entre la morfología en fresco con el índice de fragmentación en fresco.

Los resultados obtenidos en el diagrama de caja y bigotes 1, muestran una diferencia estadística significativa entre el DFI precongelación con respecto al DFI postcongelación, lo que indica que la criopreservación favorece en cierta medida el daño a la molécula del ADN.

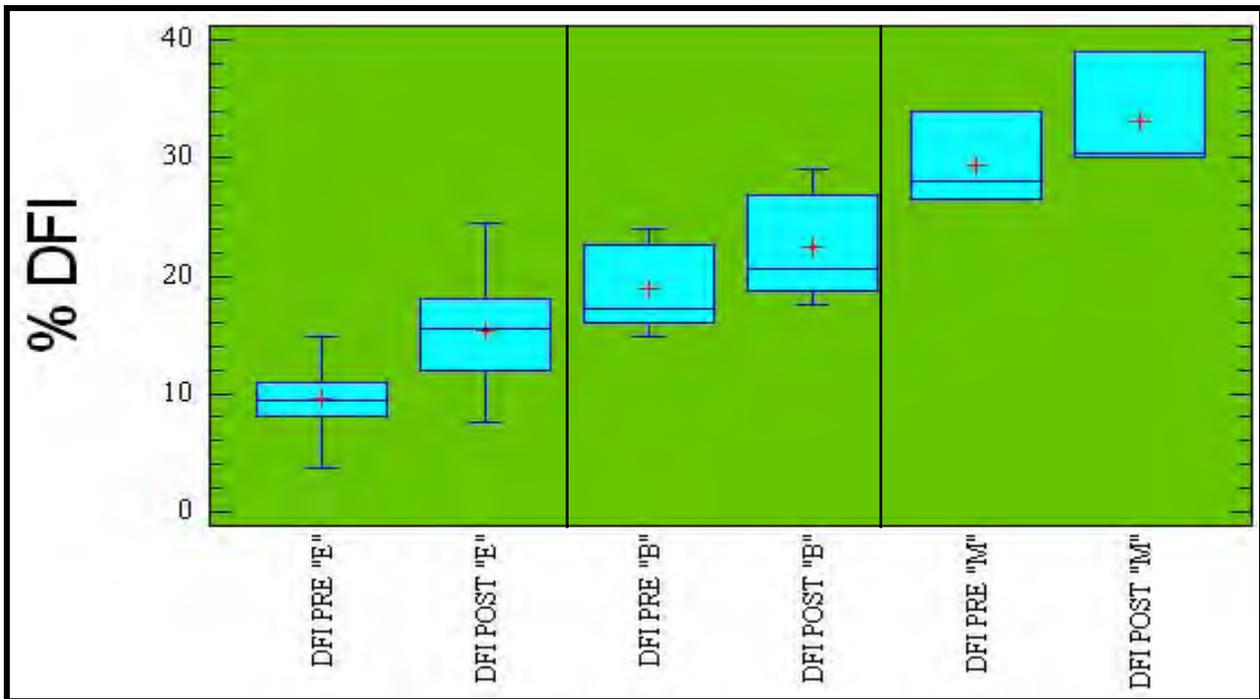
Diagrama de caja y bigotes 1. Incremento de la fragmentación de ADN en semen precongelado con respecto al postdescongelado.



El diagrama de caja y bigotes muestra el incremento de la fragmentación de ADN que tuvieron el total de las muestras, presentando una diferencia estadística significativa: P= 0.00201774

El siguiente diagrama de caja y bigotes (diagrama 2) se presentan resultados de fragmentación de ADN de tres grupos: excelente, bueno y malo (“E”, “B” y “M”) con su pre y postdescongelación respectivamente, en estos se aprecia el incremento de la fragmentación del ADN después de la criopreservación siendo significativo para las calidades de excelente y bueno, pero no así para la calidad de malo.

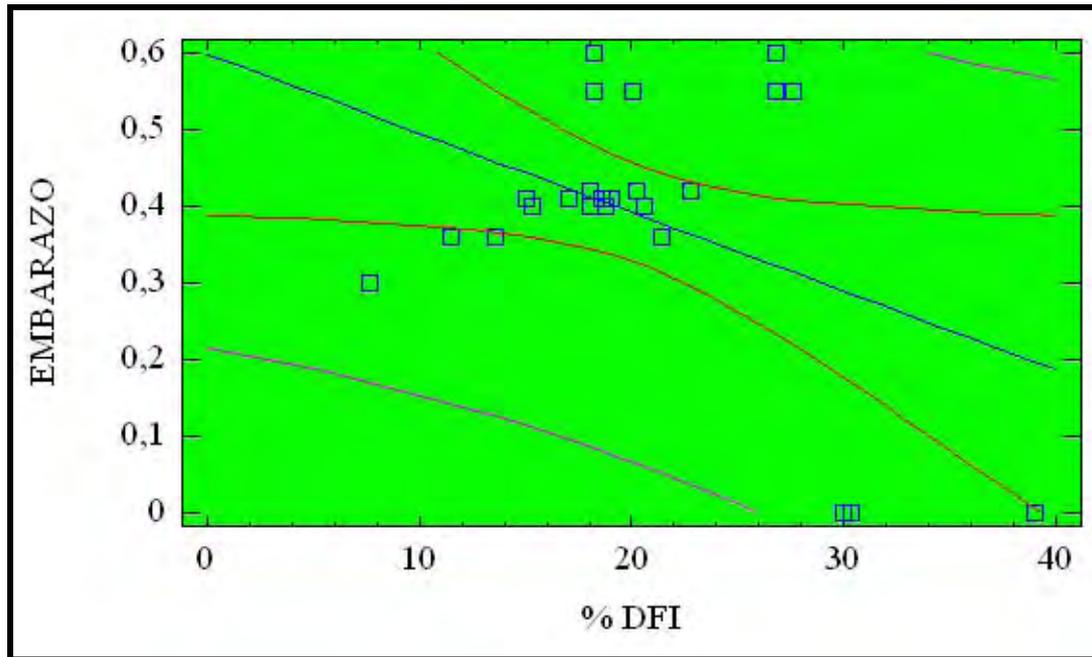
Diagrama de caja y bigotes 2. Incremento del índice de fragmentación de ADN en las calidades de Excelente, Bueno y Malo pre y postdescongelación.



Se aprecia el incremento de la fragmentación en los tres grupos, siendo significativo para calidad excelente con una $p = 0.00000293635$, bueno con una $p = 0.0287206$. En la calidad de malo este incremento no fue significativo con una $p = 0.378239$.

Con la prueba de análisis de regresión simple se mostró una correlación entre el DFI con la tasa de embarazo de los individuos (modelo 1), lo que puede indicar que a un menor daño en el ADN del espermatozoide habría una mayor probabilidad de embarazo, sin embargo cabe destacar que con muestras clasificadas con mala calidad de fragmentación o por encima del punto de corte preestablecido se han podido generar embarazos. El obtener un DFI alto indica que hay una baja probabilidad de embarazo, por el contrario un bajo índice de fragmentación obtenido en esta prueba tampoco garantiza que este se lleve a cabo, debido a que otros parámetros como la motilidad, reacción acrosómica entre otros pueden estar afectados.

Modelo 1: Correlación entre embarazo e índice de fragmentación de ADN.



En este modelo de plano ajustado se muestra que existe una baja relación lineal en los datos, esto puede deberse al bajo número de muestras que se trabajaron en este estudio. Sin embargo, los datos numéricos obtenidos por el análisis estadístico indican que si hay una relación entre el DFI y la tasa de embarazo. Ver anexo.

Las siguientes fotografías muestran el resultado de espermias fragmentados y no fragmentados.

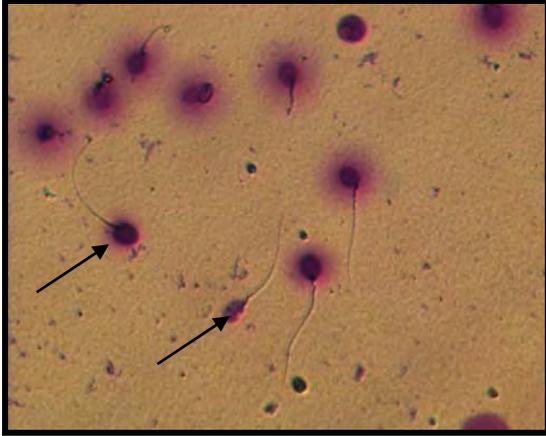


FIGURA: A



FIGURA: B

Fragmentación observada al microscopio invertido de contraste de Hofman, 400 x. Se observan espermatozoides sin fragmentación en ambas figuras (generación de halos alrededor de la cabeza del espermatozoide), así como 2 fragmentados (halo reducido y sin halo) en la figura A señalados con flechas en color negro.

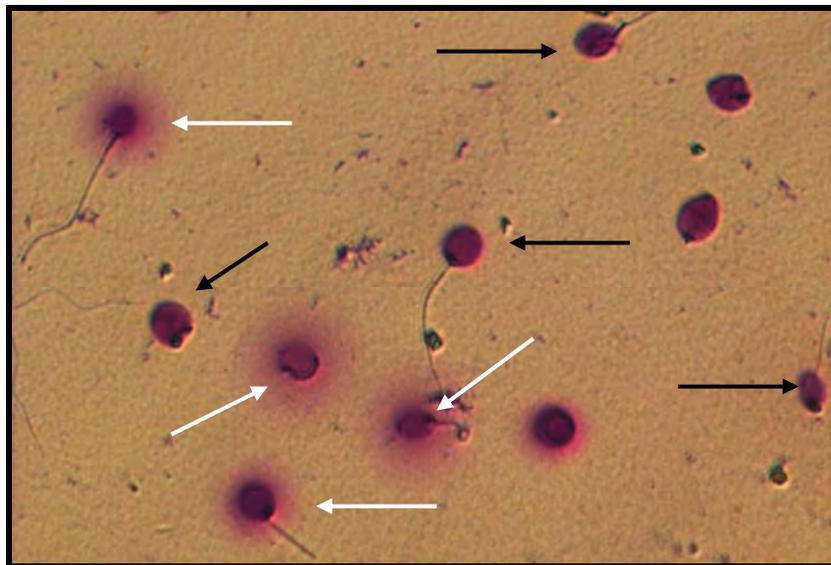


FIGURA: C

Espermatozoides fragmentados (flechas negras) y con su ADN integro (flechas blancas), microscopio invertido con contraste de Hofman, 600 x.

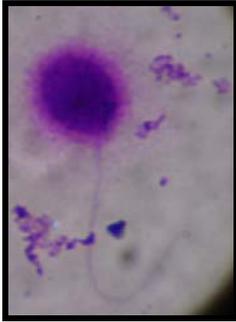


FIGURA: D



FIGURA: E



FIGURA: F

Espermatozoides fragmentados (figura D a la F); se aprecia un halo pequeño en la figura D y la ausencia de este en las figuras E y F. Microscopio de campo claro, 100 x figuras D y F, e invertido con contraste de Hofman 600 x en figura E.

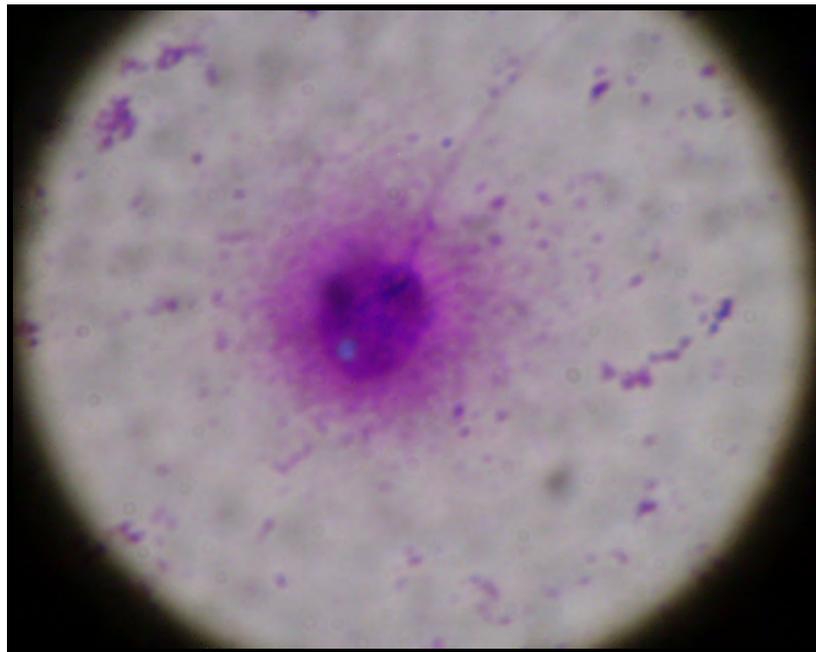


FIGURA: G

Espermatozoide con ADN integro, se aprecia claramente la formación del halo, cabeza, pieza media y flagelo. Microscopio de campo claro, 100 x.

DISCUSIÓN

La criopreservación y los servicios que se generan de esta son ampliamente utilizados en las TRA, en este caso en particular en banco de semen de donantes anónimos, el destino de las muestras pueden ser mujeres sin pareja, o parejas en las que el varón presenta una patología seminal grave, casos en los que se presente fracaso repetido en las técnicas de reproducción asistida, o bien ante la posibilidad de la transmisión de trastornos genéticos o enfermedades contagiosas al utilizar semen conyugal o enfermedades inmunitarias que hayan sido documentadas (Meseguer *et al.*, 2002; Garrido *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se utilizaron muestras de semen de individuos de fertilidad probada, en este estudio se determinaron parámetros convencionales del semen, la recuperación de las muestras tras el proceso de criopreservación y la determinación de la fragmentación en semen fresco así como descongelado de las mismas muestras.

Este estudio mostró que el proceso de criopreservación incrementa el índice de fragmentación de ADN, al igual que los resultados obtenidos por Thomson *et al* 2008. Se encontró diferencia estadística significativa entre los DFI de calidad excelente y bueno antes y después del proceso de criopreservación con una $P= 0.00000293635$ y 0.0287206 respectivamente, pero no así para la calidad mala que no mostró diferencia estadística $P= 0.378239$, en este caso se esperaba obtener un mayor grado de fragmentación de los espermatozoides bajo esta calidad por el daño que presentaron en fresco, sin embargo el daño fue mínimo después de la descongelación y no significativo.

Caso contrario con los catalogados bajo calidad excelente y bueno que después del proceso de congelación si mostraron un aumento significativo, esto pudiendo deberse al aumento o mayor generación de radicales libres de oxígeno producidos por espermatozoides inmaduros, residuos citoplasmáticos y líneas celulares ajenas al eyaculado ya que estas podrían representar un daño para toda la muestra durante la fase inicial de congelamiento y descongelación, ya que en estado de congelación o almacenamiento, la temperatura de la muestra desciende a -196° C y debido a esto no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo reacciones químicas debido a que los ROS tienen una vida media de nano a microsegundos (clasificados como radicales libres primarios o inorgánicos por su corta vida, Chihuilaf *et al.*, 2002), así mismo un exceso de entrada de Calcio a la célula también puede provocar daño al ADN por un rápido enfriamiento inicial,

ya que este actúa como cofactor de endonucleasas (enzimas capaces de fragmentar el ADN) favoreciendo el daño a dicha molécula (Roche y Romero-Alvira, 1996; Álvarez, 2005).

En presencia de los ROS, se fragmenta el ADN y aparecen fragmentos internucleosomales, formados por la ruptura del ADN entre los nucleosomas (estructuras fundamentales para la organización del ADN dentro de los cromosomas) ocasionando con ello, problemas en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina, y con ello, alteraciones en las propiedades funcionales de la misma cromatina, la cual juega un papel importante en la regulación de la transcripción genética (Cárdenas y Pedraza, 2006).

Los ROS toman como sustratos más comunes a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos (Machlin, 1987). Se debe recordar que la membrana del espermatozoide esta compuesta principalmente por colesterol y que de acuerdo con algunos autores los radicales libres se pueden formar dentro del propio núcleo del espermatozoide. La formación de los ROS se da a partir de moléculas estables mediante ruptura homolítica y reacciones de transferencia de electrones, estas se pueden originar en el espermatozoide por absorción de energía térmica (cuando se la transición de líquido a sólido, se libera como calor latente de solidificación) y reacciones catalizadas por enzimas como la superóxido dimutasa que cataliza la formación del H_2O_2 .

Agarwal y Tamer (2005) señalaron que cuando las ROS alcanzan el núcleo o se generan dentro de éste, existen mecanismos de reparación que funcionan de manera eficiente, ya que continuamente revisan que exista una adecuada secuencia de bases en la molécula de ADN, y en caso de que exista alguna mutación (ya sea ruptura, entrecruzamiento o eliminación de bases) reparan el daño causado y cuando la modificación es más extensa del ADN, actúa el sistema de reparación por escisión de nucleótidos, removiendo todo el segmento dañado a través de una nucleasa, para ser remplazado por el ADN polimerasa I y la ligasa. Sin embargo otro estudio realizado afirma que los mecanismos de reparación del ADN frente a los ROS es menos eficiente (Chihuilaf *et al.*, 2002).

Venereo (2002) indica que es en los lípidos donde se produce el daño mayor, (POL), lo cual afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados. La peroxidación lipídica, se inicia cuando las ROS atacan un ácido graso polinsaturado (AGP) y le quitan

un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el radical libre acilácido graso (Cárdenas y Pedraza, 2006; Blokhina *et al.*, 2003). Rápidamente esta molécula adiciona oxígeno y se transforma en un radical libre, peroxilo ácido graso, que actúa como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros AGP e inicia nuevas reacciones, éste mecanismo se facilita con la presencia de iones de metales de transición y por los dobles enlaces contenidos en la cadena AGP (Chihuilaf *et al.*, 2002).

Los productos finales de la POL, son lípidos peroxidados, que al degradarse originan nuevos radicales libres y una amplia variedad de compuestos citotóxicos, como los aldehídos, entre ellos 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA). Las consecuencias del daño en la estructura molecular del AGP son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las membranas celulares o subcelulares, ya que se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica produciéndose edema y por lo tanto muerte celular (Córdova *et al.*, 2009).

Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son: la naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente inicializador, los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad, la tensión de oxígeno, la presencia de hierro, el contenido celular de antioxidantes y la activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción, (Sellés, 2001).

No se encontró relación existente entre los parámetros seminales de concentración y movilidad, sin embargo con la morfología si se presento una relación significativa con el DFI en fresco, esto puede indicar que al tener una forma normal la cabeza del espermatozoide exista una mayor probabilidad de que su ADN se encuentre intacto o con un daño leve o moderado; es por ello que cuando los embriólogos realizan un ICSI uno de los requisitos que debe de cumplir el espermatozoide es poseer una buena morfología, estos resultados muestran cierta relación con los publicados por Gandini *et al* (2000), en los que encontró una relación entre los gametos que mostraron roturas en su ADN y una morfología anómala en la cabeza de los mismos.

El éxito de las técnicas de reproducción asistida depende de múltiples factores, entre ellos la integridad estructural y funcional de los gametos usados, se ha demostrado que un daño elevado en la cromatina de los espermatozoides puede tener un impacto negativo en las

TRA (Lopes *et al.*, 1998; Sakkas *et al.*, 2002). Respecto a la fragmentación del ADN y la tasa de embarazo los resultados son controvertidos, Larson-Cook *et al* y Salch *et al* en estudios independientes en 2003 no obtuvieron embarazo tras FIV/ICSI con un DFI superior al 27%, en contraste Bungum *et al* en 2004 y Payne *et al* (2005) si consiguieron embarazo tras FIV/ICSI con un DFI superior al 27% en pacientes. En el presente estudio se encontró una correlación entre el índice de fragmentación y la tasa de embarazo de acuerdo al análisis estadístico, por tanto los test para determinar el nivel de daño en el ADN podría ser utilizado también como método predictivo de las técnicas de reproducción asistida. Sin embargo el echo de obtener un DFI bajo no garantiza que se lleve a cabo el embarazo, debido a que otros parámetros seminales pueden estar alterados.

De este estudio se desprende una controversia muy grande si una muestra alcanza el máximo punto de corte postulado por Evenson *et al* 2002 (DFI = 30%), que pasa con el otro 70% de la muestra el cual se supone esta integro, es a caso que el daño detectado en la muestra nos este indicando que pueda existir otro tipo de alteración a nivel de nucleótidos incompatible con embarazos normales? Sin embargo en la práctica se han podido generar embarazos con un índice de fragmentación superior al 30%.

En caso de que un espermatozoide con daño en su ADN fecunde un oocito puede que este repare el daño del espermatozoide si este es moderado y el oocito es de buena calidad, pero en aquellos casos en los que los oocitos son inmaduros o sus mecanismos de reparación no funcionan adecuadamente (en el caso de mujeres de edad avanzad) o que hayan sufrido algún tipo de alteración de naturaleza endógena o exógena no serán capaces de reparar este daño (Álvarez, 2005). Distintos autores afirman que si el daño del ADN del espermatozoide es compatible con la vida, puede dar como resultado niños con canceres testiculares, infertilidad y enfermedades genéticas, pero en estos casos es difícil saber si el esperma que se utilizo esta fragmentado, debido a que hasta el momento no hay técnicas que permitan determinar el daño en células vivas y por tanto utilizar el espermatozoides con el menor daño posible.

Existen diferentes técnicas desarrolladas para la criopreservación, sin embargo este procedimiento sigue siendo mortal para el 40% de los espermatozoides presentes en la muestra, afectando parámetros como la motilidad (Campos *et al.*, 2005) y actividad metabólica, junto con una alteración de la membrana plasmática (Meseguer *et al.*, 2005) e

incrementado el índice de fragmentación del ADN como lo mostró este estudio con la técnica de vapores de nitrógeno y su posterior inmersión en nitrógeno líquido. Un estudio realizado por Spano *et al* en el año 2000 empleando la técnica de SCSA, mostró un daño generado por la criopreservación en la integridad nuclear del esperma, concordando con los datos obtenidos por Gandini en el 2006 utilizando la misma técnica. El método de congelación que mejores resultados de supervivencia a dado es el de congelación con píldoras de hielo seco o nieve carbónica de acuerdo con algunos autores.

CONCLUSIONES

- El proceso de criopreservación influye en la fragmentación de ADN, el enfriamiento inicial y la descongelación que se llevan a cabo en la criopreservación favorecen la fragmentación del ADN en los espermatozoides.
- Los parámetros seminales de concentración y movilidad no están relacionados con el DFI, sin embargo la morfología en fresco presentó una relación significativa con este parámetro.
- El DFI podría ser utilizado como un parámetro mas en las técnicas de reproducción asistida, por la relación que demostró tener con la tasa de embarazo, sin embargo el obtener un excelente DFI no garantiza que se logre el embarazo y/o que éste llegue a término.
- El test SCD se postula como una excelente opción para determinar la fragmentación del ADN, debido a su fácil realización y de no necesitar equipo sofisticado ni personal muy especializado a diferencia de otras técnicas, además de que puede orientar al clínico para elegir la TRA mas apropiada.

BIBLIOGRAFIA

1. Agarwal A, Allamaneni S. (2005). Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Rev Int Androl.* 3: 31-7.
2. Agarwal A, Allamaneni S. (2004). The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *Minerva Ginecol.* 56: 235-45.
3. Agarwal A, Tamer M. (2005). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *B J U Internacional.* 95: 503-507.
4. Aguilera L, Hebles M, Migueles B, González M, Dorado M, Sánchez P, Sánchez F. (2008). Influencia de la fragmentación del ADN espermático en la calidad de los embriones en ciclos de ICSI. *Revista Iberoamericana de fertilidad.* 3: 189-92.
5. Aitken R, Gordon E, Harkis D, Twigg J, Milne P, Jennings Z, Irvine D. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59: 1037-1046.
6. Al-abdulla A, Lee J. (1998). Apoptosis of retrogradely degenerating neurons occurs in association with the accumulation of perikaryal mitochondria and oxidative damage to the nucleus. *Am. J. Pathol.* 153: 447-56.
7. Alba Zayas L, Monzón Benítez G, Peláez Yáñez L, Quintero Pérez Y. (2000). Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Revista cubana de investigaciones biomédicas.* 3: 1-5.
8. Álvarez J. (2005). Estudio de la integridad del ADN espermático. *Cuaderno de medicina reproductiva.* 1: 27-35.
9. Ávila-Portillo L, Madero J, López Claudia, León M, Acosta L, Delgado L, Gómez C. (2006). Fundamentos de Criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología.* 57: 291-300.
10. Baily E, Blasco R, Mompert M. (2003). Anatomía y fisiología del aparato reproductor masculino y femenino. Editorial científico- médica. Barcelona. Pág. 234-235, 238-239.
11. Ball B. (2002). Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C₁₁-BODIPY. *J. Androl.* 23: 259-269.
12. Bassas L. (2001). Espermatogénesis e infertilidad. *Revista iberoamericana de fertilidad.* 4: 11-7.
13. Bassas Li, Mata A. (2001). Criopreservación de espermatozoides en situaciones limite. *Revista Iberoamericana de fertilidad.* 4: 45-53.

14. Baumber J, Ball B, Gravance C, Medina V, Davies-Morel M. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal Androl.* 21: 895-902.
15. Beckman K, Ames B. (1998). The free radical theory of ageing matures. *Physiology.* 78: 547-81.
16. Berne L, Koepf B. (2006). *Fisiología*. Editorial El Servier. España. Pág. 707-09.
17. Bisioli C. (2006). Criobiología de gametos. *Revista de la Sociedad Argentina de endocrinología ginecológica y reproductiva.* 2: 23-33.
18. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. Review. *Annals of botany.* 91:179-194
19. Boiso I. (2001). Principios básicos de criobiología. *Revista iberoamericana de fertilidad.*4: 20-2.
20. Bouvet B, Paparella C, Feldman R. (2007). Efecto del tabaquismo sobre la espermatogénesis en hombres con infertilidad idiopática. *Archivos españoles de urología.* 3: 273-77.
21. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. (2004). The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 19: 1401-8.
22. Burns R, Donal M. (1996). *Histology & cell biology*. Edit. Mosby. USA. Pág. 174.
23. Cárdenas R, Pedraza C. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química.* 2:164-173.
24. Campos I, López D, Muñoz M, Ruzafa C, Miralles F, Magán R. (2005). Congelación de semen. *Manual práctico de esterilidad y reproducción*. Segunda edición. McGraw-Hill. Interamericana. España. Pág. 292-293.
25. Chihuailaf H, Contreras A, Wittwer F. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México.*3: 15-19.
26. Córdova A, Ruiz C, Córdova C, Córdova M, Guerra J, Rodríguez B, Arancibia K. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista complutense de ciencias veterinarias.* 1: 1-38.
27. Cortés-Gutiérrez E, Dávila-Rodríguez M, López-Fernández C, Fernández, Gosálvez J. (2007). Evaluación del daño en el ADN espermático. *Actas urológicas españolas.* 31: 120-29.
28. Dobrinsky J. (1996). Cellular Approach to Cryopreservation of Embryos. *Theriogenology.* 45: 17-26.

29. Dorado M, Migueles B, Gonzáles M, Hebles M, Aguilera L, Sánchez P, Sánchez F, Rodríguez F, Rodríguez A, Lara J, Meyer M, Cruz N. (2008). Relación entre los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático. *Rev. Int Androl.* 6: 14-7.
30. Evenson D, Larson K, Jost L. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Pág. 23: 25-43.*
31. Evenson D, Wixon R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology.* 65: 979-991.
32. Fernández J, Muriel L, Rivera T, Goyanes V, Vázquez R, Álvarez J. (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology.* 1: 59-66.
33. Ficha de datos de seguridad, Air Liquide. (2004). Nitrógeno líquido.
34. Franks F, Morris G, Clarke A. (1981). Biophysics and biochemistry of low temperatures and freezing. *En: Effects of low temperatures on biological membranes.* Edit J Morris & A Clarke. *Academis.* Pág 3-20.
35. Galiana N, Díaz M, Montesinos L, Martín V. (2002) Pasado y presente de la criopreservación de gametos. *Quirón medicina y cirugía.* 4: 11-9.
36. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 15: 830-9.
37. Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spano M, Dondero F. (2006). Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell and Tissue Banking.* 7: 79-98
38. Garrido N, Meseguer M, Cubillos S, Vilora T. (2005). Banco de semen: organización e indicaciones. *Manual practico de esterilidad y reproducción.* Segunda edición. McGraw-Hill. Interamericana. España. Pág. 292-293.
39. Gil M, Bellver J, Romero J, Rossal L, Gutiérrez A, Escudero E, Simón C, Pellicer A, Remohí J. (2002). *Reproducción humana.* Segunda edición. McGraw-Hill. Interamericana. España. 363, 367-368.
40. Góngora A, Capilla G, Trejo P. (2003). Criopreservación espermática, impacto sobre la tasa de supervivencia y su repercusión al futuro. *Acta Medica Grupo Ángeles.*3: 132-37.
41. Gosálvez J. (2008). Retórica y fragmentación del ADN en el espermatozoide. *Revista iberoamericana de fertilidad.* 3: 141-42.

42. Gosálvez J, Fernández J, López-Fernández C. (2007). Análisis de la fragmentación del ADN mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD). *Farmaespaña industrial*. 15: 2-9.
43. Gosálvez J, Núñez-R, Caballero P, Fernández J, Cortes-Gutiérrez E, López-Fernández C. (2008). Fragmentación del ADN espermático ¿un concepto dinámico o estático? *Revista Iberoamericana de fertilidad*. 3: 195-206.
44. Gregoire A, Mayer R. (1965). The impregnators. *Fertil Steril* 16:130-34.
45. Gutiérrez R. (2007). Daño al ADN espermático: aspectos clínicos y biológicos. *Revista Cubana de Endocrinología*. 2: 1-9.
46. Guyton A, Hall J. (2001). *Tratado de fisiología medica*. Ed. McGraw-Hill interamericana, 10ª edición. España. Pág. 1108.
47. Guzmán L, López R, Llerena G, Pino J, Retuerto F. (2005). Recuperación del epitelio germinal masculino de ratones tratados con dosis única de Busulfán. *Revista Peruana de Biología*. 1: 141-44.
48. Hicks J. (2001). *Bioquímica*. Editorial McGraw-Hill. México. Pág. 900.
49. Hicks J, Torres R, Sierra M. (2006). Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de endocrinología y nutrición*. 4: 223-26.
50. Halosperm®. (2005). *Manual del usuario*. Biotec Indas Laboratorios.
51. Irvine Scientific®. (2008). *Manual de usuario*.
52. Irvine D, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, Aitken R. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 21:33-44.
53. Kreuzer H, Massey A. (2001). *ADN recombinante y biotecnología*. Ed. Acribia, S. A. 2ª edición. España. Pág. 77,79.
54. Kuntz I. (1971). Hydration of macromolecules. IV. Polypeptide conformation in frozen solutions. *J Am Chem Soc*. 2: 516-518.
55. Larson-Cook K, Brannian J, Hansen K, Kasperson K, Aamold E, Evenson D. (2003). Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and sterility*. 80: 895-902.
56. Lewis E. (2004). Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *American Society for reproductive medicine*. 82: 1443-5.
57. Lopes S, Jurisicova A, Sun J, Casper R. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 13: 896-900.

58. Machlin L. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J.* 1: 441-45.
59. Málaga Y, Ortiz D, Hernández I, Tovar J, Ayala A. (2005). Detención de la espermatogénesis. *Ginecología y Obstetricia de México.* 9: 500-8.
60. Manicardi G, Bianchi P, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biology Reproduction.* 52: 864-7.
61. Marina S. (2003). Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. *Revista Iberoamericana de fertilidad.* 4: 213-225.
62. Mazur P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J Physiol.* 247: 125-142.
63. Meseguer M, Martínez-Conejero J, Garrido N. (2005). Avances en la criopreservación de espermatozoides. *Cuaderno de medicina reproductiva.* Editores. España. Pág. 18-21.
64. Meseguer M, Ruiz A, Garrido N, Zuzuarregui J, Reis S, Escudero E, Pellicer A, Remohí J. (2002). Reproducción humana. Congelación y banco de semen: métodos, organización e indicaciones. Segunda edición. Editorial McGraw-Hill. España. Pág. 366, 368.
65. Membrillo A, Corvado A, Hicks Alejandro, Olivares-Corichi M, Martínez V, Valencia J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *INCI.* 12: 1-16.
66. Mollá M, Sellés E, Gómez E, Landeras J, Pérez-Cano I, Amorocho B, Ballesteros A. (2005). Análisis básico del semen. Manual práctico y de esterilidad y reproducción humana. 2º edición. Editorial McGraw-Hill interamericana. Pag. 271-79.
67. Morales R, Lledó B, Ortiz J. (2007). Fragmentación de ADN espermático y su implicación en la infertilidad. *Revista Iberoamericana de fertilidad.* 5: 305-13.
68. Morse H, Horike N, Rowley M, Heller C. (1973). Testosterone concentrations in testes of normal men. Effects of testosterone propionate administration. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 37: 882-886.
69. Olguín G, Guiller M, Zúñiga A, Pasquetti A. (2004). Antioxidantes y aterosclerosis. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 4: 199-206.
70. Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista colombiana de ciencias pecuarias.* 4 : 426-36.

71. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez M, Sharma R, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas J, Álvarez C. (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human reproduction*. 16: 1912-1921.
72. Payne J, Raburn D, Couchman G, Price T, Jamison M, Walmer D. (2005). Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril*. 84: 356-64.
73. Poirot C, Cherruau B. (2005). Infertilidad masculina aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2: 225-41.
74. Quintero L, López-Baeza F, Monzó A, Navarro I, Jiménez-Moreno V, Naranjo F, Santana A, Montañana V, Romeo A. (2001) Eficacia de los espermatozoides criopreservados de origen epididimario y testicular para ICSI. *Revista iberoamericana de fertilidad*. 18: 152-9.
75. Roche E, Romero-Alvira D. (1996). Alteraciones del ADN inducidas por el estrés oxidativo. *Medicina clínica*. 4: 144-53
76. Rublo L. (2001). La criopreservación embrionaria en la especie equina. *Medicina veterinaria*. 18: 527-46.
77. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi P, Bianchi U (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*. 4:31-7.
78. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi G, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*. 66: 1061-7.
79. Salch R, Agarwal A, Nada E, El-Tonsy M, Sharma R, Meyer A, Nelson D, Thomas A. (2003). Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*. 79: 1597-605.
80. Sánchez A, Santiago O, Vargas A, Mendoza M. (2004). Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo *Bioquímica*. 3:81-90.
81. Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M, Bujan L. (2005). Intégrité de l' AND des spermatozoïdes comme élément diagnostique et pronostique de la fertilité masculine. *Gynécologie, obstétrique & fertilité*. 33: 89-101.
82. Sellés S. (2001). Estudio de diferentes factores que afectan a la calidad y capacidad fecundante de los espermatozoides crioconservados en la especie porcina. Cátedra de fisiología animal. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Departamento de biología animal, Universidad de Murcia, España. Pág. 68-9.

83. Smith R, Kaune H, Parodi D, Morales I, Rios R. (2007). Aumento del daño del ADN y estrés oxidativo en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia idiopática y antecedentes de criptorquidismo. *Revista medica de Chile*. 135: 279-86.
84. Sommer D, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. (2001). Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J. Androl*. 22: 798-803.
85. Spano M, Bonde J, Hjollund H, Kolstad H, Cordelli E, Leter G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril*. 73 :43-50.
86. Stanley W, Ashworth C, Lossow W. (1982). *Anatomía y fisiología humana*. Ed. Interamericana McGraw-Hill. 4ta edición. México. Pag. 597-599.
87. Stornelli MA, de la Sota R. (2006). Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analectica veterinaria*. 25: 29-38.
88. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz M, de la Sota L. (2001). Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *Analectiva veterinaria*. 21: 56-66.
89. Stornelli MC, Tittarelli C, Savignone C, Stornelli MA. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria*. 25: 28-35.
90. Tesone M. (2006). *Reproduccion humana*. Editorial gleudeba. Buenos aires. Pág. 17-18.
91. Thomson L, Fleming S, Schulke L, Barone K, Zieschang J, Clark M. (2008). The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the AND integrity of the fresh separated preparation. *Fertility and Sterility*. 12-19.
92. Tomlinson M, Sakkas D. (2000). Is a review of Standard procedures for cryopreservation needed? *Human reproduction*. 12: 2460-2463.
93. Tresguerres J, Aguilar E, Cachofeiro M, Cardinali D, Gil-Loyzaga P, Lahera V, Martínez J, Mora S, Rodríguez R, Romano M, Tamargo J, Zarco P. (1999). *Fisiología humana*. Ed. Interamericana Mc Grawl-Hill. España. 2da edición. Pág. 1035-1037.
94. Venereo G. (2002). Daño Oxidativo, Radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*. 2:126-33.
95. Verma A, Kanwar K. (1999). Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J Androl*; 1: 151-154.

96. Vilar-Rojas C, Ruiz de Chávez I, Gonzales-Angulo A, Hicks J. (1996). Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. Arch Med Res. 27: 1-6.
97. Winchester A. (1985). Herencia, una introducción a la genética. Compañía editorial continental. México. Pág. 31.
98. World health organization. (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen cervical mucus interaction. 2ª edición. Pág. 3-11.
99. Yen S, Jaffe R, Barbieri R. (2001). Endocrinología de la reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4º edición. Editorial medica panamericana. Argentina. Pág. 664-65.

Direcciones electrónicas

- I. Borchá M. (2008). Consultado en Febrero de 2008.
<https://www.ivi.es/admin/archivo/docdow.php?id=531>
- II. Osés R. (2005). Consultado en Febrero de 2008.
www.cryo-bank.com.ar
- III. <http://www.micromegas.com.mx>
Consultado en Abril 14 de 2008.
- IV. http://www.babylon.com/definicion/reproducci%C3%B3n_asistida/Spanish.
Consultado en Agosto 15 de 2008.
- V. http://www.redlara.com/ing/PEC_LIVRO_IVAN13.ASP
Consultado en Noviembre 22 de 2008.
- VI. <http://www.pulso.com/medvet/Protegido/numero9-01/criopreservacion/criopreservacion.htm>
Consultado en Noviembre 22 de 2008.
- VII. <http://www.ceniap.go.ve/tanquenitrogeno.htm>
Consultado en Noviembre 22 de 2008.
- VIII. <http://themedicalbiochemistrypage.org/images/malesexhormones.jpg>
Consultado en Octubre 9 de 2009.

ANEXOS

Valores de referencia de los parámetros seminales de la OMS

World health organization. (1999). WHO

Volumen	≥ 2
pH	≥ 7.2
Concentración	$\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$
No. total de espermatozoides	$\geq 40 \times 10^6/\text{eyaculación}$
Movilidad	$\geq 50 \%$ progresión lineal (a+b)
Morfología	$\geq 4 \%$
Vitalidad	$\geq 75 \%$ vivos
Leucocitos	$\leq 1 \times 10^6/\text{mL}$

Pruebas estadísticas.

ANOVA Table for DFIPRECONGELACION by calidad

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1472.7	2	736.348	75.31	0.0000
Within groups	361.759	37	9.77727		
Total (Corr.)	1834.46	39			

ANOVA Table for DFIPOSTCONGELACION by calidad

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	989.107	2	494.553	26.96	0.0000
Within groups	678.788	37	18.3456		
Total (Corr.)	1667.89	39			

Comparación de Medias DFI PRE VS DFI POST CALIDAD "E"

95.0% intervalo de confianza para la media de DFI POSTCONG: 15.7474 +/- 1.89796 [13.8494,17.6454]

95.0% intervalo de confianza para la media de DFI PRECONG: 9.82739 +/- 1.28417 [8.54322,11.1116]

95.0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:

suponiendo varianzas iguales: 5.92 +/- 2.22694 [3.69306,8.14694]

contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: medial = media2
 Hipótesis alt.: medial <> media2
 suponiendo varianzas iguales: t = 5.35758 P-Valor = **0.00000293635**

Comparación de Medias DFI PRE VS DFI POST CALIDAD "B"

95.0% intervalo de confianza para la media de DFI POSTCONG: 22.2857 +/- 2.28319
 [20.0025,24.5689]
 95.0% intervalo de confianza para la media de DFI PRECONG: 19.1186 +/- 1.87531
 [17.2433,20.9939]
 95.0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:
 suponiendo varianzas iguales: 3.16714 +/- 2.81123 [0.355909,5.97838]

contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: medial = media2
 Hipótesis alt.: medial <> media2
 suponiendo varianzas iguales: t = 2.31577 P-Valor = **0.0287206**

Comparación de Medias DFI PRE VS DFI POST CALIDAD "M"

95.0% intervalo de confianza para la media de DFI POSTCONG: 33.1333 +/- 12.6309
 [20.5024,45.7642]
 95.0% intervalo de confianza para la media de DFI PRECONG: 29.4667 +/- 9.71782
 [19.7489,39.1845]
 95.0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:
 suponiendo varianzas iguales: 3.66667 +/- 10.2837 [-6.61704,13.9504]

contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: medial = media2
 Hipótesis alt.: medial <> media2
 suponiendo varianzas iguales: t = 0.989947 P-Valor = **0.378239**

ANOVA Table for CONCENTRACIONMILLOMES_ML by calidad

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	9115.61	2	4557.81	1.32	0.2791
Within groups	127637.0	37	3449.65		
Total (Corr.)	136753.0	39			

ANOVA Table for %NORMALES by calidad (MORFOLOGIA)

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	29.3767	2	14.6883	4.01	0.0266
Within groups	135.598	37	3.66482		
Total (Corr.)	164.975	39			

ANOVA Table for a_B by calidad (MOVILIDAD A+B EN FRESCO)

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	587.152	2	293.576	3.37	0.0453
Within groups	3225.82	37	87.1844		
Total (Corr.)	3812.97	39			

ANOVA Table for A1_B1 by calidad (MOVILIDAD A+B POSTDESCONGLEACION)

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	341.208	2	170.604	1.45	0.2480
Within groups	4358.17	37	117.788		
Total (Corr.)	4699.38	39			

ANOVA Table for CONCENTRACIONMILLOMES_ML by calidad

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	9115.61	2	4557.81	1.32	0.2791
Within groups	127637.0	37	3449.65		
Total (Corr.)	136753.0	39			

CORRELACION DE EMBARAZO:

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between EMBARAZO and DFI. The equation of the fitted model is

$$\text{EMBARAZO} = 0,598073 - 0,0102885 \cdot \text{DFI}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.05, there is a statistically significant relationship between EMBARAZO and DFI at the 95% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 17,1653% of the variability in EMBARAZO. The correlation coefficient equals -0,41431, indicating a relatively weak relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0,154485. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

The mean absolute error (MAE) of 0,107616 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is less than 0.05, there is an indication of possible serial correlation. Plot the residuals versus row order to see if there is any pattern which can be seen.

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0,113747	1	0,113747	4,77	0,0395
Residual	0,548909	23	0,0238656		
Total (Corr.)	0,662656	24			