



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**FRAGMENTACIÓN DEL ADN DE ESPERMATOZOIDES DE
DONANTES DE BANCO DE SEMEN: EFECTO DE LA
CRIOPRESERVACIÓN**

T E S I S

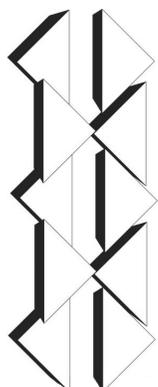
PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A

JOSÉ ROBERTO VAZQUEZ AVENDAÑO

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA
Instituto Valenciano de Infertilidad, México

ASESOR INTERNO
Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM



México, D.F.

Mayo del 2012



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.

Jurado Asignado

Presidente: Dra. Patricia Rosas Saucedo

Vocal: M. en C. Pedro Cuapio Padilla

Secretario: Dr. Juan José Rodríguez Mercado

1er. Suplente: Biól. María Cristina Alvarado Domínguez

2° Suplente: Dra. Juana Monroy Moreno

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto Valenciano de Infertilidad, México y Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Agradecimientos

A mi mamá

Por el amor y cariño que siempre me ha tenido y el apoyo incondicional que me ha brindado durante mi formación académica.

A mis hermanos

Mario, Raúl, Gabriel, Andrés y Luz por su cariño y apoyo que ha sido importante para mi formación, también a mi hermano político Agustín por el apoyo que me ha ofrecido.

A mis amigos

Ruy, Tanya, Maricarmen, Verónica, Cesar, Alfonso, Mitzi, Carlos, Daniel, Elizabeth Cristóbal, Francisco, Gabriela, Víctor, Lourdes, Pavel, Esmeralda, Fabiola, Ivette, Marisol, Blanca, Alfredo, Leo, Luz, Ascensión, Miriam, Noemí, Edith, Itzel y Beto por su amistad y las experiencias que compartimos juntos y que siempre recordaré; también quiero agradecer a Angeles por su amistad, los momentos gratos que compartimos y la casualidad de haberla conocido.

A mi compañera de laboratorio y amiga

Alexis con quien trabajé durante la elaboración de mi tesis y compartí gratos momentos.

Este trabajo ha sido posible gracias al Instituto Valenciano de Infertilidad y la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Agradezco a mi director de tesis Pedro Cuapio Padilla, director del laboratorio de andrología y banco de semen del Instituto Valenciano de Infertilidad sede en México, por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis con él e instruirme durante la realización de ésta.

A Luis Ángel Quezada Castillo por compartir conmigo su experiencia, conocimiento y amistad.

A mi asesor interno el Dr. Juan José Rodríguez Mercado y la Dra. Patricia Rosas Saucedo por los comentarios y observaciones que enriquecieron mi trabajo y formación académica.

A la Dra. Juana Monroy Moreno y la Biól. María Cristina Alvarado Domínguez por las aportaciones que mejoraron la calidad de mi tesis.

También agradezco al equipo de trabajo IVI, México y en particular a Héctor, Ricardo e Iván que de una u otra manera contribuyeron con la realización de mi tesis.

Quiero dedicar este trabajo a mis queridas sobrinas
Fernanda, Dafne, Leslie y Aideé que apenas empiezan
a vivir y que tienen todo un camino por recorrer.

Índice	Pág.
Índice de abreviaturas	<i>iii</i>
Resumen	<i>iv</i>
I. Introducción	1
II. Marco teórico	2
1. Aparato reproductor masculino.....	2
2. Reproducción e infertilidad humana.....	13
3. Técnicas de reproducción asistida.....	16
4. Donación y banco de semen.....	18
5. Criopreservación de espermatozoides humanos.....	20
6. Ácido desoxirribonucleico.....	25
III. Planteamiento del problema	35
IV. Hipótesis	35
V. Objetivos	36
VI. Materiales y métodos	37
1. Recolección de la muestra.....	37
2. Seminograma.....	37
3. Criopreservación del semen.....	40
4. Recuperación espermática.....	40
5. Técnica de dispersión de la cromatina espermática.....	43
6. Resultados de las técnicas de reproducción asistida de muestras de donante.....	45
7. Análisis estadístico.....	45
VII. Resultados	46
1. Valoración de los parámetros seminales antes y después de la criopreservación de muestras de donante.....	46
2. Evaluación de la fragmentación del ADN espermático pre y postcriopreservación de muestras de donante.....	48
3. Establecimiento de la correlación entre la fragmentación del ADN y la movilidad espermática.....	48
4. Determinación de la correlación entre la fragmentación del ADN y los resultados de muestras de donante empleadas en técnicas de reproducción asistida.....	49

VIII. Discusión.....	51
IX. Conclusiones.....	55
X. Glosario.....	56
XI. Bibliografía.....	58

Índice de abreviaturas

ACP: agentes crioprotectores

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATP: trifosfato de adenosina

DFI: índice de fragmentación del ADN

ERO: especies reactivas de oxígeno

FIV: fertilización *in vitro*

IA: inseminación artificial

IAD: inseminación artificial heteróloga (semen de donante)

IAH: inseminación artificial homóloga (semen de la pareja)

ICSI: inyección intracitoplasmática del espermatozoide

P1: protamina 1

P2: protamina 2

SCD: técnica de la dispersión de la cromatina espermática

TRA: técnicas de reproducción asistida

Resumen

La integridad del ADN del espermatozoide es vital para la correcta transmisión del genoma paterno al ovocito en el momento de la fecundación y el posterior desarrollo embrionario que culmina con un recién nacido.

Se sabe de diversos factores (estrés oxidante, apoptosis, cáncer, varicocele, infecciones del tracto genital) que causan fragmentación del ADN en los espermatozoides entre ellos se encuentra la criopreservación, que es empleada frecuentemente en los centros de reproducción asistida para resguardar muestras seminales.

Por este motivo en el presente estudio se evaluó la fragmentación del ADN espermático y los parámetros seminales antes y posterior a la criopreservación de muestras de donante y su implicación en los resultados de las técnicas de reproducción asistida.

Los resultados mostraron que el proceso de criopreservación aumentó significativamente la fragmentación del ADN espermático (5.6 ± 2.3 vs 10.5 ± 4.9 ; $P < 0.05$) y disminuyó el número de espermatozoides con movilidad progresiva rápida (0.03 ± 0.3 vs 0.0 ± 0.0 ; $P < 0.05$) y lenta (60.2 ± 6.4 vs 45.3 ± 7.3 ; $P < 0.05$), aumentó el número de espermatozoides con movilidad no progresiva (13.3 ± 3.3 vs 13.9 ± 3.7 ; $P < 0.05$) e inmóviles (26.4 ± 6.4 vs 40.8 ± 8.2 ; $P < 0.05$).

Se observó una correlación positiva ($r = 0.410$, $P < 0.05$) entre la fragmentación del ADN y los espermatozoides inmóviles posterior a la criopreservación.

Finalmente, cuando se presentaron dos ovocitos viables para ser fecundados por IAD, se observó una correlación negativa entre la fragmentación del ADN espermático y la obtención de gemelos bivitelinos ($r = -0.480$, $P = 0.002$), de igual manera cuando se transfirieron dos óvulos fertilizados por ICSI al útero materno, se observó una correlación negativa entre la fragmentación del ADN espermático y la obtención de gemelos bivitelinos ($r = -0.504$, $P = 0.039$).

El proceso de criopreservación aumentó la fragmentación del ADN y disminuyó la movilidad espermática; existe una relación entre la integridad del ADN y el número de espermatozoides inmóviles posterior a la criopreservación; la integridad del ADN de los espermatozoides favoreció la obtención de gemelos bivitelinos cuando se generaron dos ovocitos viables para ser fecundados por IAD o se transfirieron dos óvulos fecundados por ICSI al útero materno.

I. Introducción

La reproducción de las especies es resultado de una serie de procesos biológicos que involucran la interacción del gameto masculino con el femenino y la unión de ambos para desarrollar un nuevo organismo y de esta manera perpetuar la especie (Silverthorn, 2008).

Los espermatozoides son los gametos masculinos cuya función es la de alcanzar al ovocito y fusionarse con él para transmitir la información genética paterna contenida en la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Ruiz, 1988). Dicha molécula se encarga de la transmisión, expresión y conservación del genoma de un organismo en particular (Bloomfield y col, 2000).

Durante la formación de los espermatozoides y su posterior traslado a través del tracto reproductor masculino y femenino se llegan a presentar ciertos eventos tales como el incorrecto empaquetamiento de la cromatina durante la espermiogénesis, apoptosis y la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el eyaculado, dando lugar a la fragmentación del ADN en los espermatozoides (Angelopoulou y col, 2007).

La fragmentación del ADN es el conjunto de rupturas presentes en sitios específicos de dicha cadena que impiden la íntegra transmisión de la información genética. Algunas causas externas que inducen fragmentación del ADN en los espermatozoides son la contaminación, tabaquismo y la temperatura testicular elevada; entre las patológicas se encuentran el cáncer, varicocele, criptorquidia e infecciones del tracto genital entre otras (Morales y col, 2007). También se ha observado fragmentación del ADN posterior a la criopreservación, entre otras alteraciones como la formación de hielo intracelular, daños a la membrana plasmática y reducción de la movilidad espermática (Fernández y col, 2009).

La criopreservación de semen se emplea para mantener la capacidad fecundante de los espermatozoides hasta el momento de ser utilizados en procedimientos de reproducción asistida. Las muestras seminales son almacenadas en los bancos de semen, en tanques de nitrógeno líquido a -196°C y son un servicio integrado a los centros de reproducción asistida para preservar muestras seminales de pacientes y donantes (Góngora, 2003).

La donación de semen es un acto voluntario por el cual un varón realiza una cesión de sus gametos para que éstos sean utilizados con la intención de lograr embarazos en aquellas parejas y mujeres que lo requieran, los criterios de selección de donantes se basan en el estado de salud y las características seminales como lo son la concentración, la movilidad y la morfología espermática, entre otras (WHO, 2010).

II. Marco teórico

1. Aparato reproductor masculino

El aparato reproductor masculino está constituido por dos testículos, los conductos sexuales anexos (conductos deferentes, ampollas deferenciales, conductos eyaculatorios y la uretra) y las glándulas accesorias (vesículas seminales, próstata y las glándulas bulbouretrales) (Figura 1) (Ballescá, 1999; Marieb, 2001).

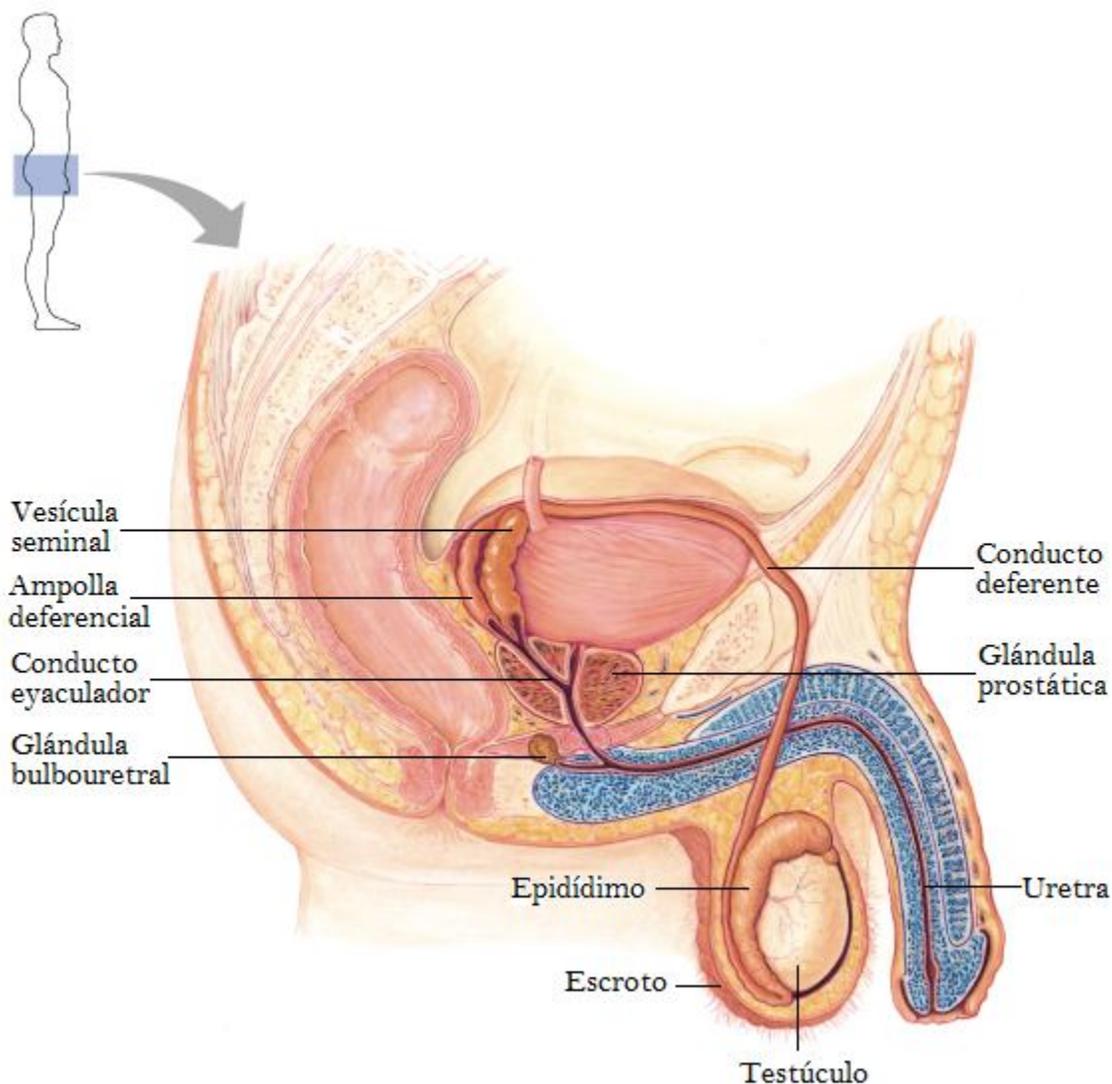


Figura 1. Aparato reproductor masculino (modificado de Marieb, 2001).

Testículos

Los testículos son estructuras ovoides con dimensiones de 4 a 5 cm en su eje mayor y de 2.5 a 3 cm en su eje menor, con 20 cm³ de volumen y peso entre 15 y 20 g cada uno. Dentro del testículo se encuentran los tubos rectos, la red testicular (rete testis), los conductos

eferentes y los conductos del epidídimo que están conectados a los conductos deferentes, los cuales forman parte de los conductos sexuales anexos (Figura 2) (Ballescá, 1999; Marieb, 2001; Krawetz, 2005).

El parénquima testicular está dividido en compartimentos piramidales llamados lobulillos testiculares, cada uno de ellos está constituido por no más de cuatro túbulos seminíferos que miden de 30 a 70 cm de longitud y alrededor de 300 túbulos se encuentran dentro del testículo (Figura 2) (Arrondo y Pomerol, 1994; Marieb, 2001; Krawetz, 2005).

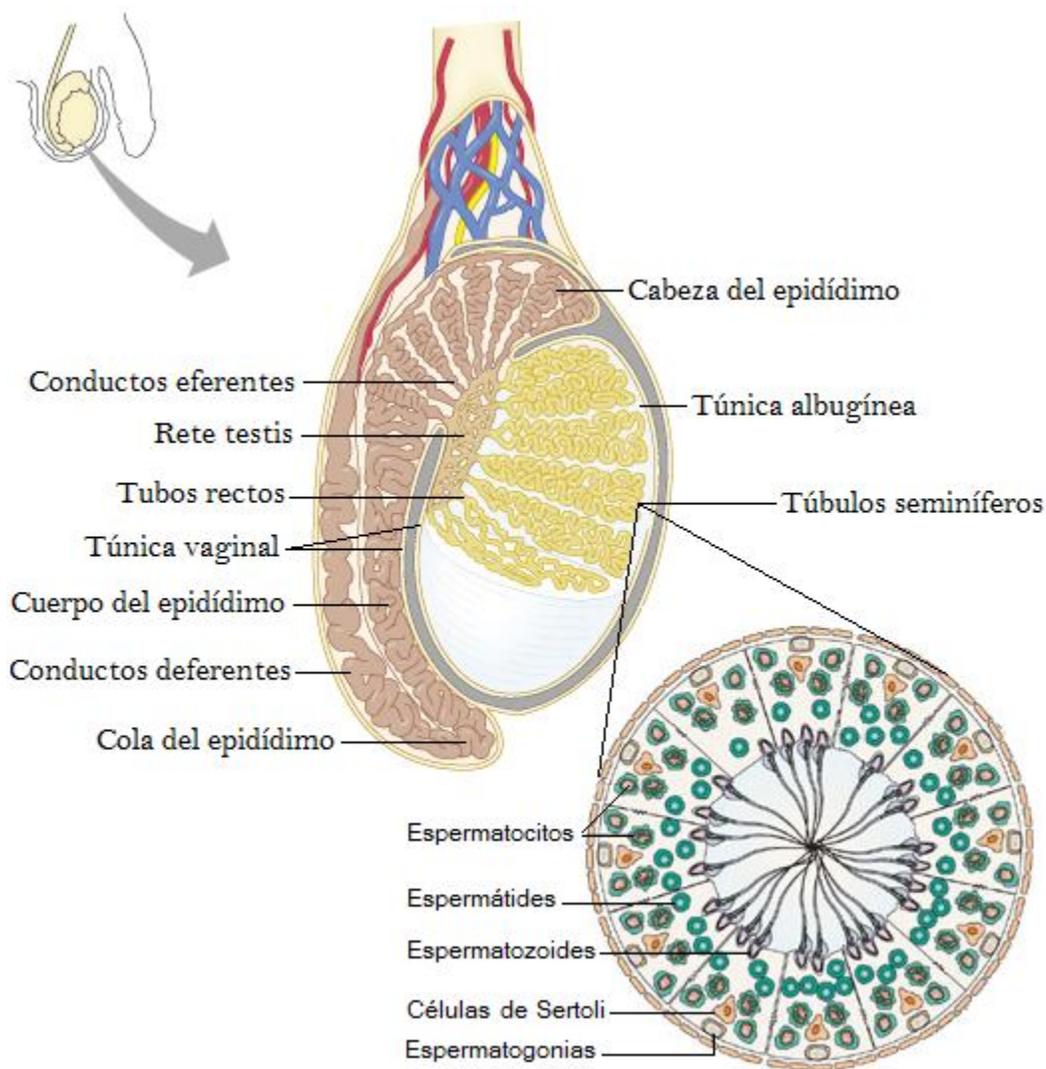


Figura 2. Testículo y corte de tubo seminífero (modificado de Marieb, 2001; Krawetz, 2005).

Alrededor de los túbulos seminíferos está el tejido testicular intersticial, donde se encuentran las células de Leydig que secretan andrógenos y sustancias bioactivas (péptidos derivados de la proopiomelanocortina) involucradas en la regulación paracrina y autocrina de la función testicular. Dentro de los túbulos seminíferos se diferencian las células de

Sertoli y las células germinales en diferentes estadios de maduración proyectándose hacia la luz tubular (Figura 2). El porcentaje relativo de los componentes del epitelio seminífero del adulto es 22% de espermatogonias, 24% de espermatoцитos, 21% de espermátides, 20% de espermatozoides y 13% de células de Sertoli (Tähkä, 1986; Arrondo y Pomerol, 1994; Jones, 1997).

Las células de Sertoli poseen una forma triangular cuyo citoplasma presenta finas prolongaciones que engloban numerosas células germinales en diferentes estadios de maduración. Poseen un núcleo ovoide con grandes nucléolos flaqueados por dos o tres masas de cromatina, los cromocentros. El citoplasma contiene retículo endoplasmático rugoso y liso, mitocondrias y puentes citoplasmáticos que permiten la comunicación intercelular como lo es el intercambio molecular entre ellas para regular su crecimiento y diferenciación (Monesi, 1982; Ballescá, 1999).

Las células de Sertoli sintetizan y proporcionan factores de nutrición para el metabolismo de las células germinales (lactato, transferrina y proteína fijadora de andrógenos entre otros) y secretan proteínas y factores paracrinos que proveen señales intercelulares para la maduración de las células germinales (factor de crecimiento semejante a la insulina, factor de célula madre y factores de crecimiento transformante α y β), por otra parte fagocitan el exceso de células germinales expulsándolas en forma de cuerpos residuales antes de la maduración espermática. Se describe que cada célula de Sertoli está en contacto con 47 células germinales y con otras cinco células de Sertoli (Ballescá, 1999; Pérez, 2007; Walker y Cheng, 2005).

Entre las membranas de las células de Sertoli se forma un complejo de unión conocido como barrera hematotesticular, la cual bloquea el paso de sangre y sustancias linfáticas del espacio intersticial hacia el interior de los túbulos seminíferos con el fin de crear un sitio inmunológicamente indetectable para los espermatozoides en formación, ya que podrían ser reconocidos como células ajenas al organismo por su contenido haploide. Dicha barrera divide a los túbulos seminíferos en dos compartimentos separados (Arrondo y Pomerol, 1994; Pérez, 2007):

- El compartimento basal que es la porción del túbulo seminífero externa a los complejos de unión y contiene las espermatogonias y los espermatoцитos diploides.
- El compartimento yuxtaluminar que es la parte de los túbulos seminíferos interna a los complejos de unión y contiene las fases más avanzadas de la espermatogénesis.

Los testículos se encuentran dentro de una bolsa llamada escroto (Figura 1), la cual tiene dos compartimentos y cada uno de ellos contiene un testículo. El escroto se encarga de regular la temperatura testicular para la adecuada espermatogénesis mediante la localización de los testículos fuera de la cavidad corporal, donde la temperatura se encuentra 3.1°C por debajo de la temperatura corporal normal (37°C). Dicha regulación se encuentra mediada por los receptores de temperatura localizados en el escroto, de manera que si la temperatura es demasiado baja, el músculo se contrae causando el arrugamiento de la piel escrotal y el ascenso de los testículos a la región más cálida de la ingle (Jones, 1997).

Los testículos se encargan de la producción de espermatozoides y la secreción de hormonas proteicas y esteroideas. Estas funciones no son autónomas, sino que están reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal mediante mecanismos estimuladores e inhibidores (Figura 3) (Arrondo y Pomerol, 1994; Ballescá, 1999; Marieb, 2001; Krawetz, 2005).

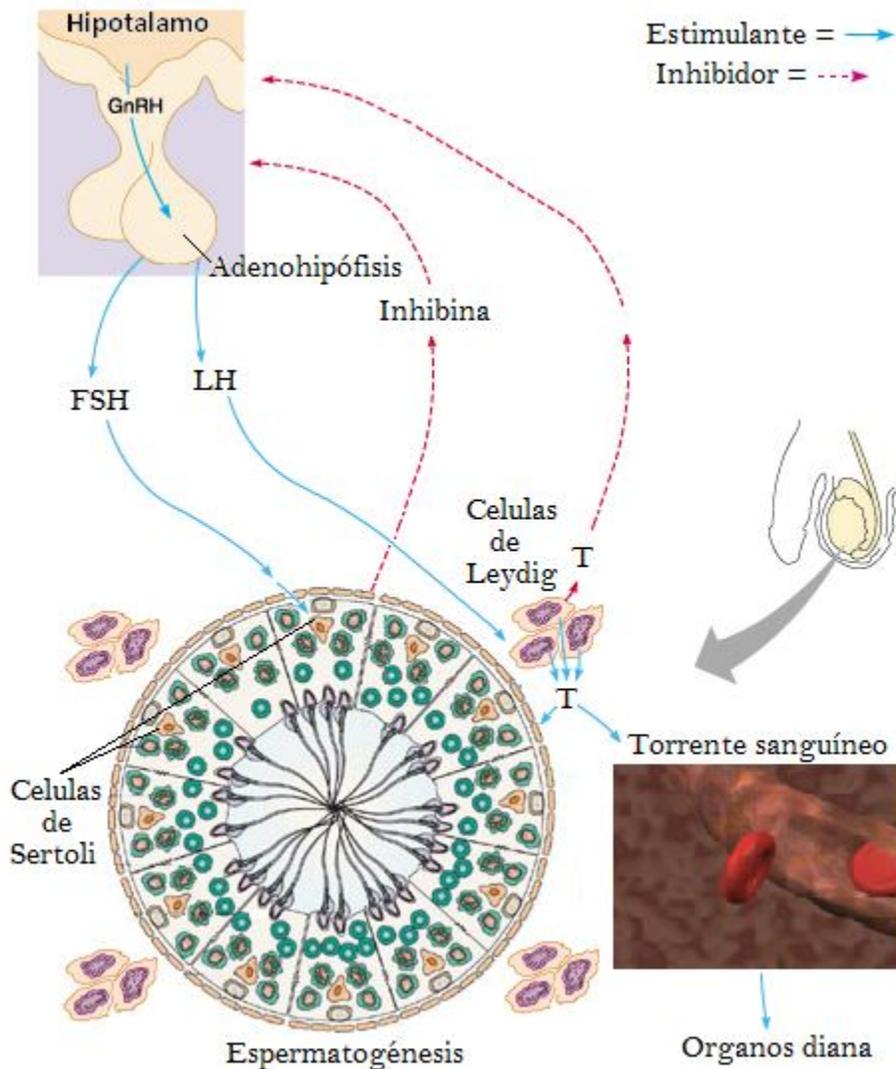


Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, (GnRH) hormona liberadora de las gonadotropinas, (FSH) hormona estimulante del folículo, (LH) hormona luteinizante, (T) testosterona (modificado de Marieb, 2001; Krawetz, 2005).

En el hipotálamo se encuentran neuronas que producen la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y es liberada de forma pulsátil y cíclica con un pico cada 90 minutos. A su vez la GnRH estimula la adenohipófisis que secreta la hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH) conocidas como gonadotropinas, ambas hormonas ejercen su efecto sobre los testículos activando al monofosfato de adenosina cíclico como segundo mensajero que a su vez activa sistemas enzimáticos específicos en las células diana respectivas (Figura 3) (Guyton, 2001; Pérez, 2007).

La LH se une a receptores específicos en las células de Leydig que estimulan la secreción de testosterona, necesaria para la conversión de espermatoцитos primarios a secundarios durante la espermatogénesis, también se encarga de mantener la función de las glándulas accesorias e iniciar y mantener los caracteres sexuales secundarios (Arrondo y Pomerol, 1994; Pérez, 2007).

La secreción de testosterona está regulada por un proceso de retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo y la adenohipófisis inhibiendo así la secreción de LH, lo que resulta en la disminución de la síntesis de testosterona por las células de Leydig (Figura 3) (Guyton, 2001; Marieb, 2001; Krawetz, 2005).

La espermatogénesis está regulada por la testosterona y la FSH que se une a receptores específicos en las células de Sertoli, donde estimula la síntesis de moléculas paracrinas necesarias para la mitosis de las espermatogonias y la transformación de espermatoцитos secundarios a espermátides. También secreta proteínas como la inhibina y la proteína fijadora de andrógenos que es liberada al lumen de los túbulos seminíferos donde se une a la testosterona y otros andrógenos necesarios para mantener la función del epitelio que reviste a los tubos eferentes y estimular la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (Arrondo y Pomerol, 1994; Pérez, 2007).

En presencia de una población considerable de células espermáticas en el epitelio seminífero, las células de Sertoli liberan inhibina de manera continua que actúa en la adenohipófisis inhibiendo la producción de FSH y en el hipotálamo inhibe la secreción de GnRH, como consecuencia disminuye la rapidez de la espermatogénesis. Por el contrario si hay muy pocas células espermáticas, las células de Sertoli frenan la liberación de inhibina y la producción de FSH aumenta (Figura 3) (Arrondo y Pomerol, 1994; Guyton, 2001; Marieb, 2001; Krawetz, 2005).

Conductos sexuales anexos

Son los encargados de transportar a los espermatozoides hacia el exterior. Se inician con los tubos rectos que unen a los túbulos seminíferos con la red testicular (rete testis) de la cual se originan los conductos eferentes que salen a la superficie por la cara posterior del testículo y se unen con el epidídimo, en donde los espermatozoides son almacenados temporalmente, de 9 a 12 días durante los cuales se producen fenómenos de maduración. El conducto del extremo distal de epidídimo se endereza gradualmente para continuar con el conducto deferente que se extiende desde la cola del epidídimo hasta las vesículas seminales, dicho conducto presenta una dilatación (ampolla deferencial) en cuyo extremo distal desemboca el conducto de la vesícula seminal. A partir de aquí, la vía seminal continúa con el conducto eyaculador que atraviesa la glándula prostática y finalmente desemboca por un pequeño orificio en la uretra prostática, éste último es un tubo que se extiende desde la vejiga urinaria a través del piso de la cavidad pélvica y atraviesa longitudinalmente al pene para terminar en una apertura externa llamada meato uretral. A lo largo de todo el tubo uretral se encuentran glándulas que segregan un fluido ligeramente viscoso, cuyo papel es la lubricación del tracto uretral antes de la eyaculación (Figura 1) (Arrondo y Pomerol, 1994; Jones, 1997).

Glándulas accesorias sexuales

Las glándulas accesorias sexuales masculinas incluyen la glándula prostática, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales, donde las dos primeras segregan casi la totalidad del plasma seminal y el 80% del volumen total del eyaculado (Arrondo y Pomerol, 1994).

La glándula prostática aproximadamente del tamaño de una castaña se encuentra rodeando la uretra posterior o prostática y abraza el orificio vésico uretral (Figura 1). Ésta segrega un líquido opalescente ácido (pH de 6.5) que constituye del 15 al 30% del volumen total del plasma seminal y se presenta en el primer tercio del eyaculado. Es la fuente principal de ácido cítrico y fosfatasas ácidas del semen, también contiene enzimas proteolíticas, calcio, zinc, magnesio, fibrinolisisina y beta glucoamilasa (Arrondo y Pomerol, 1994; Jones, 1997).

Las vesículas seminales son un par de bolsas glandulares de 7 cm de longitud y no más de 5 cm de ancho; están situadas cercas de la parte superior de la próstata. Cada vesícula seminal se une a la ampolla de los conductos deferentes para formar el conducto eyaculador que atraviesa la próstata (Figura 1). Su líquido compone del 50 al 75% del volumen total del plasma seminal y constituye la segunda porción del eyaculado. Estas glándulas secretan un fluido viscoso y ligeramente amarillento con pH alcalino, el cual es rico en potasio, bicarbonatos, fosfatos, magnesio, prolactina, insulina, ácido ascórbico, prostaglandinas fosforilcolina, proteínas y fructuosa (Arrondo y Pomerol, 1994; Vásquez y Vásquez, 2007).

Las glándulas bulbo uretrales o de Cowper son dos y cada una tiene el tamaño de un guisante, se encuentran a ambos lados de la uretra membranosa y sus conductos atraviesan la uretra bulbar para desembocar en la uretra esponjosa (Figura 1). El producto secretado por estas glándulas es un líquido claro, viscoso y de aspecto mucoso que contiene ácido oxálico, galactosa y galactosamina. Se vierte de manera gradual a la uretra bajo estimulación y sirve como lubricante previo a la eyaculación (Arrondo y Pomerol, 1994).

Semen

El semen se compone de los espermatozoides provenientes del testículo y del líquido del epidídimo, la glándula prostática, las vesículas seminales y pequeñas cantidades procedentes de las glándulas bulbouretrales que conjuntamente confieren al semen un pH de 7.5 aproximadamente. En el plasma seminal actúa una enzima llamada fibrinógenasa proveniente de la próstata que hace al fibrinógeno derivado de las vesículas seminales formar un débil coagulo de fibrina, el cual se disuelve en pocos minutos (de 15 a 30 min) debido a la lisis de la fibrinolisisina formada a partir de la profibrinolisisina prostática (Guyton, 2001).

El plasma seminal contiene agua que transporta a los espermatozoides, mucosa que actúa como lubricante para el paso del semen a través del aparato reproductor masculino, soluciones amortiguadoras que neutralizan la acidez de la uretra vaginal, nutrientes para los espermatozoides (fructosa, glicerolfosfatidilcolina, carnitina, ácido cítrico y ascórbico), prostaglandinas (E₂, 19-hidroxi PGE) y cantidades muy elevadas de zinc (Cuadro I) (Jones, 1997; Denison y col, 1999).

Cuadro I. Componentes del líquido seminal

Epidídimo	Vesículas seminales	Glándula prostática	Glándulas bulbouretrales
Agua	Agua	Agua	Agua
Carnitina (nutriente)	Fructosa (nutriente)	Bicarbonato (neutraliza el pH vaginal)	Amortiguadores (neutralizan el pH vaginal)
Glicerilfosfatidilcolina (nutriente)	Fibrinógeno (coagula el semen)	Fibrinógenasa (coagula el semen)	Mucosa (lubricante)
	Acido ascórbico (nutriente)	Acido Cítrico (nutriente)	
	Prostaglandinas (contraen los vasos deferentes)	Prostaglandinas	

Tomado de Jones, 1997.

Espermatogénesis

La espermatogénesis es el mecanismo por el cual se forman los espermatozoides y se divide en tres etapas, la primera está relacionada con la multiplicación mitótica y la maduración de las espermatogonias, la segunda involucra la meiosis y la última comprende la transformación de las espermatídes a espermatozoides. En el varón tiene una duración total de 65 a 70 días aproximadamente (Monesi, 1982; Arrondo y Pomerol, 1994).

Las espermatogonias son células diploides que se dividen en tres tipos; espermatogonias tipo A que incluyen los subtipos A1, A2, A3 y A4; espermatogonias intermedias y del tipo B que incluyen B1 y B2 (Monesi, 1982; Pérez, 2007).

La espermatogénesis inicia con las espermatogonias A que requieren de cinco procesos mitóticos para formar a las espermatogonias B que a su vez se diferencian en espermatoцитos primarios. Un grupo de espermatogonias A sirven como células de tallo germinal, dividiéndose en más espermatogonias A para reemplazar a las que se diferenciaron en B y así mantener la producción continua de células germinales (Monesi, 1982; Pérez, 2007).

Los espermatoцитos en base a su posición dentro de los túbulos seminíferos y la progresión de la profase meiótica se dividen en primarios y secundarios; los espermatoцитos primarios experimentan una reducción de su número cromosómico ($2n$; 46 cromosomas) a un número haploide (n ; 23 cromosomas) tras la primera división meiótica. La meiosis es exclusiva de los gametos y se caracteriza por crear nuevas combinaciones de genes a partir de los cromosomas paternos y maternos, este fenómeno se conoce como entrecruzamiento y es el responsable de las variaciones fenotípicas encontradas en todos los organismos de un mismo grupo que se reproducen sexualmente (Figura 4) (Ruiz, 1988; Veeck, 1999; Klug y col, 2012).

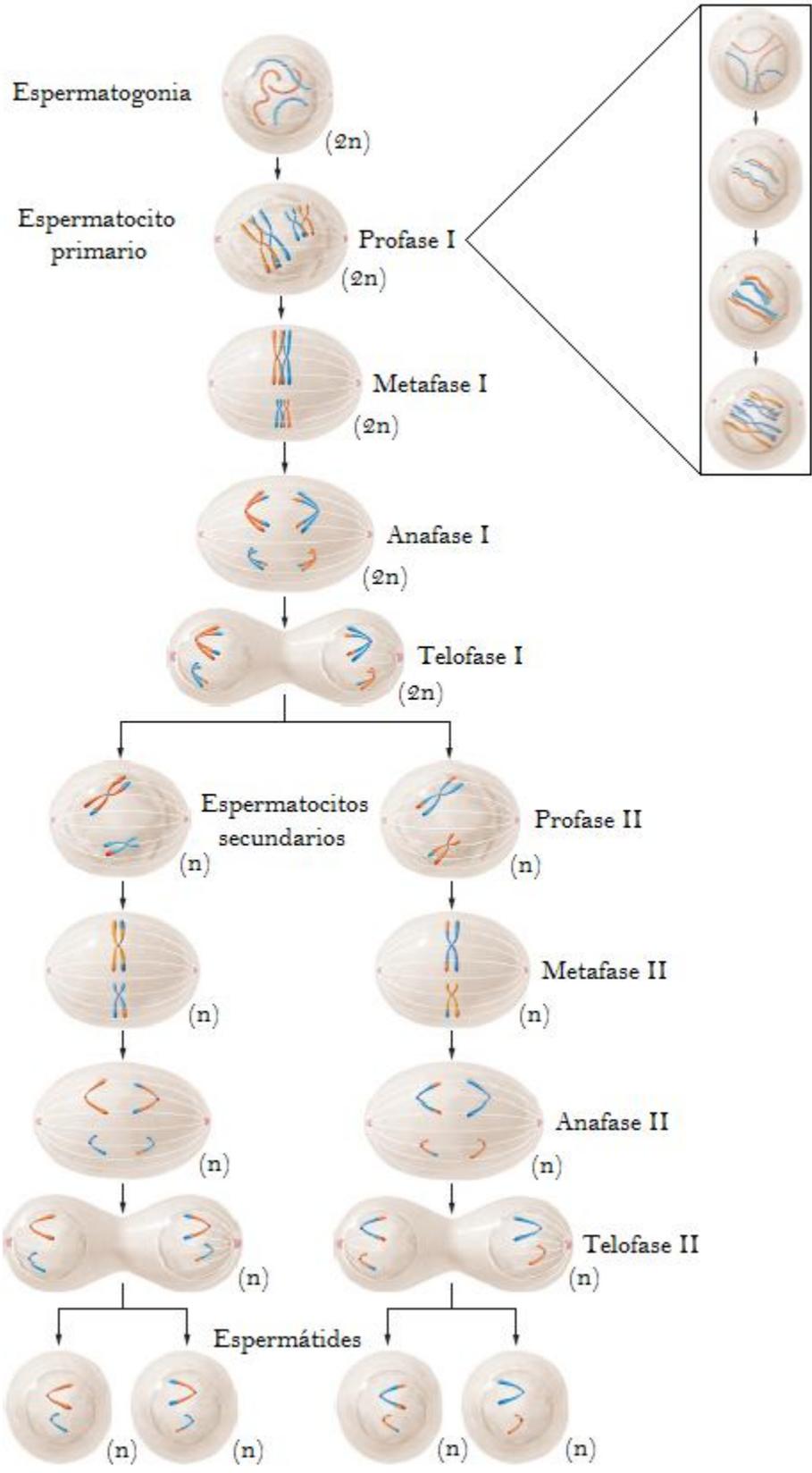


Figura 4. Meiosis (modificado de Klug y col, 2012).

Al finalizar la primera división meiotica se obtienen los espermatozoides secundarios que ya poseen un número haploide de cromosomas y cada uno de ellos esta conformado por dos cromatidas no hermanas. Después los espermatozoides secundarios entran a la segunda división meiotica que genera a las espermátides, cuyos cromosomas son una sola estructura. Por cada espermatozoides primario diploide se generan cuatro espermátides haploides (Figura 4) (Guyton, 2001).

Las espermátides se transforman en espermatozoides por el proceso de espermiogénesis que en base a la biogénesis acrosomal se divide en cuatro fases (Barth y Oko, 1989):

Golgi

Durante esta fase se forman pequeños gránulos proacrosómicos dentro del aparato de Golgi, cada uno de ellos se encuentra confinado dentro de una vesícula limitada por una membrana. Conforme progresa el desarrollo estos granulos se fusionan y forman un gránulo acrosómico único dentro de una vesícula que se adhiere a la membrana del futuro núcleo espermático en el polo anterior. Por otra parte uno de los centriolos que se localiza en el polo opuesto de la célula originará el flagelo (Figura 5) (Ruiz, 1988; Marieb, 2001).

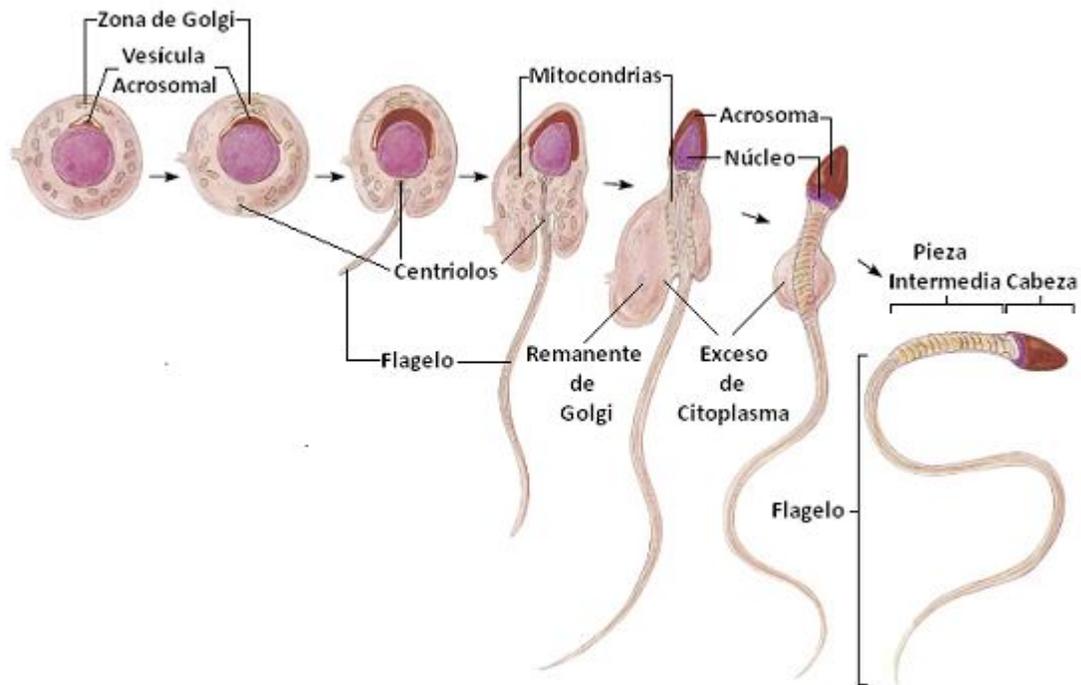


Figura 5. Espermiogénesis (modificado de Marieb, 2001).

Casquete

La vesícula acrosómica se distribuye y forma un casquete que rodea los dos tercios anteriores del núcleo, el cual se compacta al cambiar de histonas a **protaminas**, de manera que no puede haber replicación ni transcripción (fase G0 del ciclo celular). Mientras tanto los dos centriolos migran de la periferia del citoplasma hacia el

núcleo; el centriolo proximal se localiza en el polo posterior del núcleo mientras que el centriolo distal actúa como corpúsculo basal para el flagelo que hasta el momento solo consta de filamento axial (Monesi, 1982; Olivera y col, 2006).

Acrosómica

El núcleo se desplaza a la periferia de la célula, se alarga y aplanada un poco y su cromatina se condensa progresivamente. La espermátide en este momento gira de manera que el acrosoma queda dirigido hacia la pared del túbulo seminífero. Conforme progresa el desarrollo la masa de citoplasma se desplaza detrás del polo caudal del núcleo y se alarga para rodear la parte proximal del flagelo. El cuerpo cromatoide, una estructura especial que está presente dentro del citoplasma se aproxima al centriolo distal para formar una estructura en forma anular alrededor del flagelo que se denomina anillo. Las mitocondrias que se encuentran distribuidas en la periferia del citoplasma, migran hacia la porción del flagelo que se encuentra dentro del citoplasma y lo rodean. Al mismo tiempo los microtúbulos del citoplasma se reúnen para formar una estructura cilíndrica, llamada vaina caudal que se inserta en el núcleo y rodea la parte inicial del flagelo (Figura 5) (Monesi, 1982; Marieb, 2001).

Maduración

El núcleo toma una forma piriforme y aplanada mientras que el acrosoma adopta la forma de éste. El anillo que rodea al flagelo se mueve de manera que marca los límites entre la parte media y la parte principal del flagelo. Se forman nueve fibras largas o externas alrededor de los filamentos axiales que corren a lo largo del flagelo y terminan un poco antes de su final. Estas fibras externas se fusionan para formar una vaina a nivel de los centriolos, la cual representa el punto de inserción del flagelo y constituye la pared de la porción que lo conecta con el cuello. A nivel de la parte proximal del flagelo las mitocondrias se alinean en espiral alrededor de las fibras externas y forman la vaina mitocondrial de la pieza media (Figura 5) (Monesi, 1982; Marieb, 2001).

Espermatozoide

El espermatozoide es el gameto masculino cuya función es la aportación del material genético paterno al ovocito en el momento de la fecundación. Fue descrito por primera vez en 1677 por Leeuwenhoek (Ruiz, 1988; Ballezá, 1999). El espermatozoide está cubierto por una membrana plasmática y conformado por:

Cabeza

Presenta una forma piriforme y aplanada que mide de 4 a 5 μm de longitud por 2.5 a 3.5 μm de ancho. La cabeza se compone de dos partes, el núcleo en donde se encuentra el ADN y el acrosoma que cubre los dos tercios anteriores del núcleo. Éste último está constituido por dos membranas, una externa que se encuentra en estrecho contacto con la membrana plasmática y otra interna que está separada de la membrana nuclear por un espacio llamado subacrosómico. Las dos membranas están unidas por una línea denominada segmento ecuatorial, creando un espacio

entre ambas donde se encuentran diversas enzimas hidrolíticas (hialuronidasa, acrosina e hidrolasa ácida) que facilitan el paso del espermatozoide a través del *cumulus oophorus* y la zona pélucida (Figura 6) (Gerton, 2002; Yoshinaga y Toshimori, 2003; Zini y Libman, 2006).

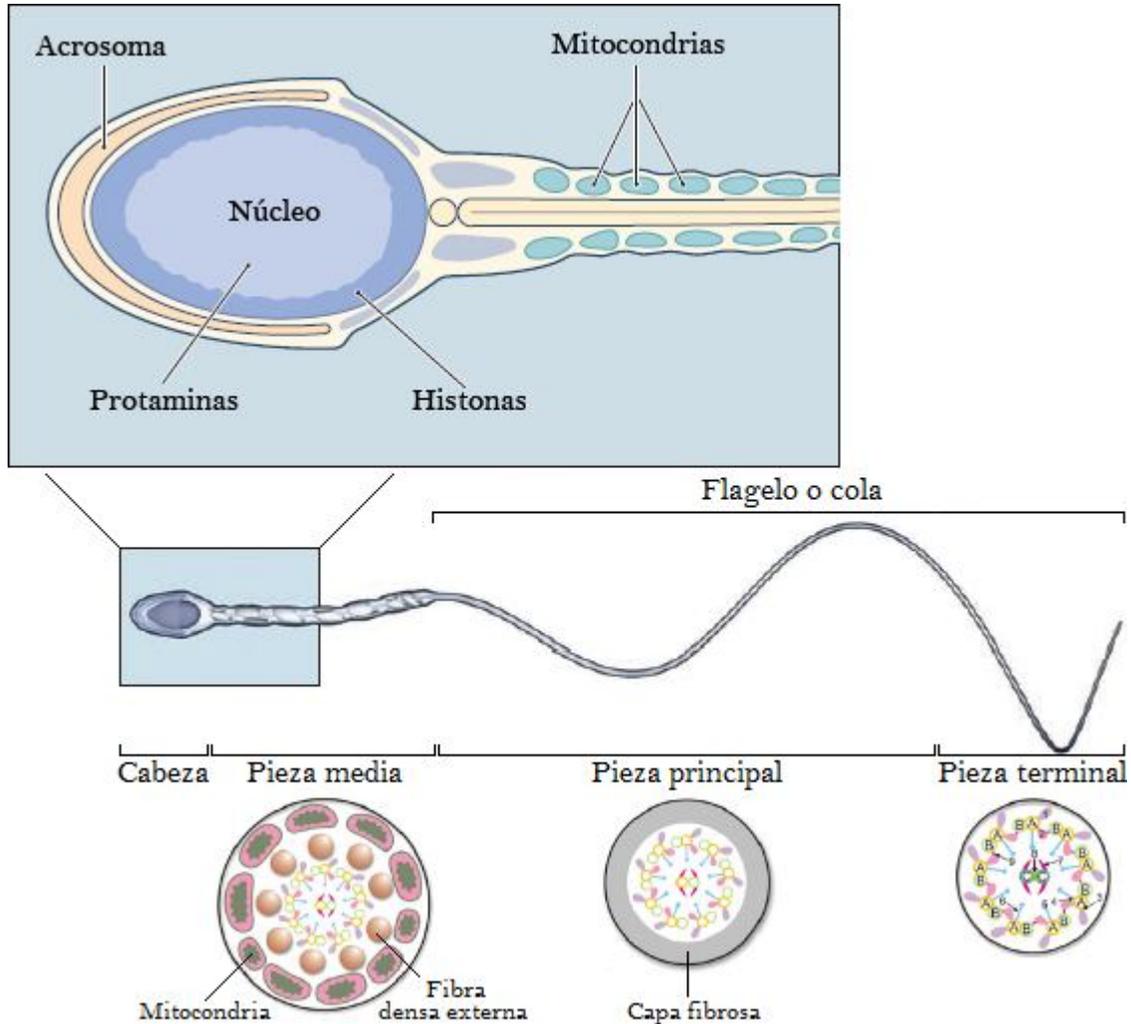


Figura 6. Espermatozoide (modificado de Zini y Libman, 2006; Olivera y col, 2006).

Flagelo

Se distinguen tres partes; la pieza media (de 5 a 7 μm de largo por 1 μm de ancho) que se extiende desde el centriolo hasta el anillo y se encuentra rodeada por una vaina de 75 a 100 mitocondrias dispuestas en espiral, estas últimas generan energía para la motilidad del flagelo; la vaina mitocondrial es rica en fosfolípidos ligados a proteínas y contiene varias enzimas oxidantes. La pieza principal de 45 μm de largo se encuentra cubierta por una vaina fibrosa. Finalmente la pieza terminal (de 5 μm de longitud) se compone de los filamentos axiales que están encerrados dentro de la membrana plasmática. El espesor del flagelo disminuye gradualmente desde el

anillo hasta su pieza terminal (Figura 6) (Monesi, 1982; Guyton, 2001; Zini y Libman, 2006).

El complejo de filamentos axiales o axonema está constituido por dos microtúbulos centrales rodeados por nueve pares de microtúbulos; cada par está compuesto por un microtúbulo completo denominado subunidad A y otro incompleto llamado subunidad B. El componente proteico fundamental de estos microtúbulos es la **tubulina**, que se presenta en forma α y β . De cada microtúbulo A emergen unos brazos hacia el microtúbulo B del par adyacente, el cual posee a su vez unos brazos dirigidos hacia A. Estos brazos están constituidos por **dineína** que se encarga de transformar la energía mitocondrial en motilidad a partir de la energía liberada por la enzima trifosfatasa al fragmentar ATP (Monesi, 1982; Farrel, 1982).

2. Reproducción e infertilidad humana

La reproducción en el reino animal involucra conductas específicas de cada especie, diseñadas para asegurar la unión del espermatozoide con el ovocito y de ésta manera perpetuar la especie. En el humano dichas conductas se les conoce como acto sexual y se dividen en excitación, meseta, orgasmo y resolución. Durante estas fases los genitales de ambos géneros se preparan para la cópula con la finalidad de que el semen sea depositado en el tracto reproductor femenino (Silverthorn, 2008).

Al finalizar la licuefacción del coágulo de semen, los espermatozoides comienzan a nadar a través del aparato reproductor femenino hasta alcanzar al ovocito en la región de la ampolla uterina en las trompas de Falopio, lugar donde ocurre la fecundación (Zaneveld y col, 1991; Velázquez, 2009).

Los espermatozoides en el tracto reproductor femenino experimentan modificaciones bioquímicas de las proteínas y lípidos de membrana que les permiten adquirir el potencial para hiperactivarse y lograr la reacción acrosómica, este proceso se denomina capacitación espermática (Zaneveld y col, 1991; Velázquez, 2009).

Una vez que el espermatozoide alcanza al ovocito, penetra la capa de células del *cumulus oophorus* para alcanzar la zona pelúcida que es una capa gelatinosa no celular compuesta por glucoproteínas y cuya función es el reconocimiento especie específico espermático, el cual evita la fertilización por espermatozoides no humanos y previene la **polispermia** (Olivera y col, 2006; Velázquez, 2009).

La zona pelúcida es disgregada por enzimas liberadas del acrosóma durante la reacción acrosomal, permitiendo el paso del espermatozoide para alcanzar el espacio perivitelino, en donde se produce la adherencia entre la membrana plasmática de la zona ecuatorial espermática y las microvellosidades de la membrana citoplasmática del ovocito, se fusionan ambas membranas y ocurre el cambio del potencial de membrana del ovocito que cambia la polaridad interna de la zona pelúcida y la remodelación de ésta, impidiendo la polispermia (Olivera y col, 2006).

Finalmente el núcleo del espermatozoide ingresa al citoplasma del ovocito para formar el cigoto conformado por dos pronúcleos y dos cuerpos polares. El cigoto se forma cuando ocurre la ruptura de la membrana pronuclear y los cromosomas maternos y paternos se reorganizan. Este fenómeno trae como consecuencia biológica el restablecimiento del número cromosómico, la determinación genética del sexo y la primera división mitótica (Ruiz, 1988).

En algunas parejas la unión entre el ovocito y el espermatozoide no se lleva a cabo, dicha circunstancia se le conoce como esterilidad y cuando se logra el embarazo pero éste no finaliza se denomina infertilidad; estos problemas son de origen multifactorial que interfieren con el proceso reproductivo (Poongothai y col, 2009).

Aproximadamente del 10 al 15% de las parejas en edad reproductiva no pueden completar un embarazo después de un año de relaciones sexuales sin protección, que a nivel mundial representa alrededor de 60 a 80 millones de parejas con problemas de fertilidad. De estas el 40% se debe al factor femenino, 20% al factor masculino, 25% a ambos y el 15% restante es desconocido (ASRM practice committee, 2006a y 2006b; Huidobro, 2010).

La infertilidad es primaria cuando nunca ha llegado a término el embarazo o secundaria cuando con anterioridad se ha presentado el embarazo con un recién nacido pero posteriormente no se consigue otro (Poongothai y col, 2009). Se estima que 1 de cada 20 hombres tiene algún tipo de problema de fertilidad con bajo número de espermatozoides en el eyaculado (Huidobro, 2010).

La fertilidad del hombre se diagnostica por el análisis de los aspectos físicos del semen como volumen, pH, viscosidad, color y olor y los aspectos celulares de los espermatozoides tales como la concentración, vitalidad, movilidad y morfología. En el cuadro II se muestran los valores normales del semen que establece la organización mundial de la salud (WHO, 1999).

Cuadro II. Parámetros normales del semen humano

Volumen	≥ 2.0 ml
pH	≥ 7.2
Vitalidad	≥ 50% vivos
Morfología	> 14% de formas normales
Concentración	≥ 20x10 ⁶ espermatozoides/ml
Número total de espermatozoides	≥ 40x10 ⁶ espermatozoides/eyaculación
Movilidad	≥ 50% de tipo (a + b), o ≥ 25% de tipo a

WHO, 1999.

La capacidad reproductiva de la especie humana es baja si se toma en cuenta que la probabilidad máxima de embarazo en período fértil es del 30 al 35% (Rosas, 2007). Las causas de infertilidad masculina son variables y las más comunes se describen en el cuadro III.

Cuadro III. Principales causas de infertilidad masculina

Patología	Definición
Azoospermia	Se define a la situación en la que hay ausencia de espermatozoides en el semen debido a diferentes factores como la obstrucción de los conductos seminales o una deficiencia de la secreción hormonal.
Problemas de eyaculación	Se puede deber a procesos que interfiera con la inervación del conducto deferente y el cuello de la vejiga o problemas de eyaculación prematura.
Criptorquidea	Es la anomalía congénita más frecuente de los genitales masculinos y se refiere a la ausencia del descenso testicular a la cavidad escrotal.
Infecciones de las glándulas accesorias	Su impacto radica en el efecto directo del agente patógeno sobre el espermatozoide, así como también sobre la función de estas glándulas.
Varicocele	Se caracteriza por la dilatación del plexo pampiniforme testicular debido a un reflujo venoso. Sin embargo, no todos los hombres que presentan varicocele son infértiles.
Trastornos endocrinos	Se describen de acuerdo a la glándula afectada en tiroideos, suprarrenales, hipotalámicos e hipofisarios.
Trastornos genéticos	En términos genéticos, la infertilidad puede ser clasificada como causa de un único defecto en un gen específico o a defectos cromosómicos que se dividen a su vez en numéricos y estructurales.
Agentes gonadotóxicos	La denominación de gonadotóxicos se aplica a productos químicos, drogas, tabaco, alcohol u otras sustancias que tienen un efecto supresor o tóxico sobre la producción, movilidad y morfología de los espermatozoides.
Trastornos tumorales	Se dividen en primarias, si se originan en testículo y secundarias si son metástasis de otros sitios; a su vez, los tumores testiculares se dividen en capsulares y parenquimatosos; estos últimos son más frecuentes y se dividen en germinales, si se originan en dichas células, y no germinales, cuando proceden de las estructuras restantes del parénquima testicular.
Envejecimiento	Con la edad la función reproductiva en los varones declina, aunque no en forma abrupta y temprana como en las mujeres. Dicha declinación se le conoce como andropausia y afecta tanto a la espermatogénesis como a la producción hormonal, en especial a la testosterona y al estradiol.
Infertilidad idiopática	Hace referencia aquellos pacientes que tienen un análisis normal de semen, sin que se pueda identificar su etiología.

Elaborado a partir de Brugo-Olmedo y col, 2003; Narváez, 2004; Pérez, 2007; Remohí y col, 2008; Huidobro, 2010.

Estas causas tienen mayor o menor incidencia en los hombres dependiendo del tipo de población; por ejemplo en la figura 7 se muestran los porcentajes de las causas de infertilidad masculina encontradas en una población mexicana (Góngora-Rodríguez, 2005).

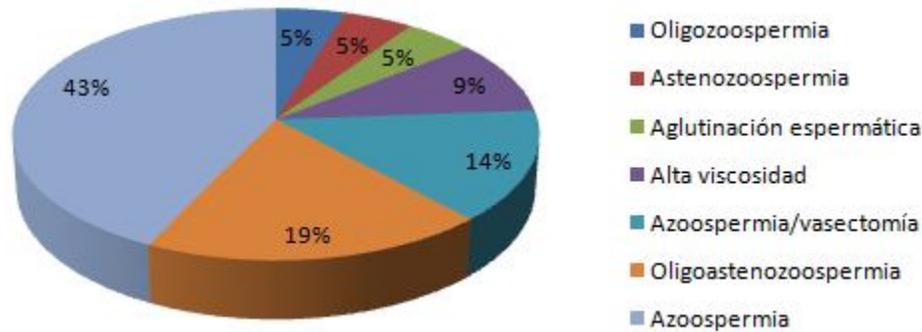


Figura 7. Causas de infertilidad masculina en una población mexicana (elaborado a partir de Góngora-Rodríguez, 2005).

3. Técnicas de reproducción asistida

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) surgen con el objetivo de aumentar la probabilidad de fecundación y lograr el embarazo con un nacido vivo en aquellas parejas con problemas de fertilidad. Su efectividad se puede medir de múltiples maneras, como probabilidad de implantación por embrión transferido, probabilidad de embarazo, número de nacimientos y nacidos vivos. Las TRA se clasifican de acuerdo a la dificultad del procedimiento en baja y alta complejidad. La primera incluye el coito programado y la inseminación artificial (IA), la segunda engloba la fecundación *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI, de sus siglas en inglés) (Jausoro, 2000).

Coito programado

Se refiere a la realización de relaciones sexuales dirigidas durante los días de probable ovulación, constituyendo de esta manera la técnica más sencilla de reproducción asistida. Puede llevarse a cabo en ciclo natural o por estimulación ovárica (Bonilla-Musoles y col, 2009):

- En ciclo natural las pacientes no reciben ningún tipo de medicación y la ovulación se controla mediante ecografía, temperatura basal o por la concentración de LH en orina. La paciente debe de tener ciclos menstruales regulares. Las tasas de gestación que se consiguen son bajas (10%), por lo que son pocos los ciclos que se controlan bajo estas circunstancias.
- En ciclo inducido se lleva a cabo por la administración de hormonas (gonadotropinas urinarias o recombinantes) o fármacos (**citrato de clomifeno**), siendo este último la primera opción a elegir por su sencillez y disponibilidad; en el empleo de gonadotropinas es imprescindible el control ecográfico y hormonal. Se logra un 30% de gestaciones después de cuatro ciclos.

Inseminación artificial

Se define como el depósito de espermatozoides de forma no natural en el aparato reproductor femenino con la finalidad de lograr la gestación. Esta técnica contempla una serie de procedimientos tales como la estimulación del desarrollo folicular para obtener no más de dos ovocitos, recuperación y capacitación espermática, control de la fase lútea para la correcta sincronización entre el momento de la ovulación y el día de la inseminación (Jausoro, 2000; Bonilla-Musoles y col, 2009).

Debido a su sencillez, bajo costo y posibilidad de preparación en los consultorios médicos de cualquier ginecólogo se ha convertido en la técnica de reproducción asistida más empleada. Dependiendo de la procedencia del semen la IA puede ser clasificada en dos grandes grupos, inseminación artificial con semen de pareja u homóloga (IAH) e inseminación artificial con semen de donante o heteróloga (IAD) (Jausoro, 2000).

Existen varias vías de inseminación como la intracervical, intrauterina, intratubárica, intraperitoneal e intrafolicular, pero sólo la intrauterina (homóloga o heteróloga) se practica. La inseminación intrauterina consiste en depositar a los espermatozoides lo más próximo a las trompas, los cuales por su rapidez vencerán la barrera del cuello y ascenderán a las trompas. El índice de éxito oscila alrededor del 15 al 25% por ciclo con una tasa acumulada del 55 al 65% después de cuatro ciclos, siempre y cuando el número de espermatozoides inseminados con movilidad lineal progresiva postcapacitación sea mayor o igual a tres millones (Jausoro, 2000; Bonilla-Musoles y col, 2009).

Fecundación *in vitro*

La FIV consiste en la co-incubación de óvulos y espermatozoides de tal manera que el proceso para lograr la fecundación, depende de la interacción al azar de los gametos (Matorras y col, 2008).

La realización de esta técnica implica someter a la mujer a un ciclo de estimulación ovárica para garantizar la maduración del mayor número posible de ovocitos, los cuales son recuperados por punción folicular mediante control ecográfico y posteriormente fecundados *in vitro* con semen fresco si procede de la pareja o congelado si es de donante. Los óvulos inseminados son guardados junto con medio de cultivo en una incubadora con temperatura, humedad y condiciones de CO₂ y aire controladas. De los embriones obtenidos lo ideal es transferir dos al útero materno para aumentar la tasa de embarazo, los restantes son congelados (Jausoro, 2000; Galán y col, 2008; Matorras y col, 2008).

Tiene una tasa de éxito del 30% por ciclo con una tasa acumulada del 75 al 85% después de tres ciclos (Bonilla-Musoles y col, 2009).

Inyección intracitoplásmica del espermatozoide

La ICSI consiste en la microinyección de un espermatozoide previamente seleccionado en el interior de un ovocito (Zulategui y col, 2008). Para ello el ovocito debe haber sido liberado previamente de la capa de células del *cumulus oophorus* que lo rodean. Los procedimientos a seguir en la ICSI son los mismos que para la FIV, con la diferencia de que la inseminación se realiza por micromanipulación de los gametos (Jausoro, 2000; Matorras y col, 2008).

Dicha técnica ha supuesto un avance importante para las parejas infértiles por defectos severos del semen; en estos casos la técnica de ICSI da lugar a tasas de fertilización significativamente superiores a las de FIV. Sin embargo existe el riesgo de transmitir alteraciones genéticas o generar malformaciones congénitas cuando se emplean espermatozoides inmaduros del epidídimo o el testículo (Jausoro, 2000; Poongothai y col, 2009).

4. Donación y banco de semen

La donación de semen es un acto voluntario mediante el cual un varón realizará una cesión de sus gametos para que éstos sean utilizados con la intención de lograr embarazos en (WHO, 2010):

- Parejas en las cuales el varón padezca de anomalías significativas de los espermatozoides o del fluido seminal, disfunción eyaculatoria, defectos genéticos importantes e infecciones de transmisión sexual que no se puedan erradicar.
- Parejas en las cuales la mujer sea Rh negativa y esté severamente inmunizada mientras que el varón sea Rh positivo.
- Mujeres sin pareja masculina.

Los donantes de semen deben cubrir requisitos que aseguren el embarazo, por lo tanto, lo ideal es que sean personas jóvenes entre 18 y 35 años, que gocen de buena salud física con alta y continua producción de espermatozoides. Los candidatos a donantes de semen se someten a un exhaustivo análisis para descartar enfermedades considerables o alteraciones genéticas que puedan afectar a la descendencia (Góngora, 2003; Gijón, 2009).

Debido al lapso de tiempo que transcurre desde la obtención de la muestra de semen, el análisis de ésta y hasta el momento de su utilización en procedimientos de reproducción asistida, es necesario mantener a los espermatozoides bajo condiciones óptimas que prolonguen su lapso de vida en lugares donde puedan estar almacenados, con éste fin se establecieron los bancos de semen (tanques de nitrógeno líquido a -196°C) (Pardo, 1994).

El banco de semen es un servicio integrado en determinados centros de reproducción asistida que permite la criopreservación de muestras de semen con la finalidad de conservar

la capacidad fecundante de los espermatozoides hasta el momento de su utilización en las TRA (Garrido y Meseguer, 2008).

Un banco de semen puede ser utilizado para la criopreservación seminal en diferentes casos como la imposibilidad de recabar dicha muestra en el momento oportuno del ciclo, preventiva con fines reproductivos en muestras de pacientes que se realizarán la vasectomía o se someterán a tratamientos de radioterapia o quimioterapia (pacientes oncológicos) y muestras de semen de donante que de manera anónima se destinan a parejas o mujeres que lo requieran (Góngora, 2003, Gijón, 2009).

El utilizar muestras de semen congeladas permite el estricto control sanitario para reducir los riesgos de diseminación de enfermedades tanto hereditarias como infecciosas, como el caso del VIH que se comprueba rutinariamente mediante la presencia de anticuerpos en sangre frente al virus; dado que éstos solo son detectables en suero seis meses después del contacto con el virus, las muestras de donante deben pasar un periodo de cuarentena de seis meses. Posteriormente se comprobará la cero negatividad de marcadores de VIH para que las muestras puedan ser utilizadas con seguridad. Otra ventaja que tiene el utilizar muestras congeladas es que permite el transporte de éstas a otras zonas geográficas (Pardo, 1994; Garrido y Mesenguer, 2008; Gijón, 2009).

Las muestras de semen congeladas pueden almacenarse durante periodos de tiempo indefinidos, sufriendo un deterioro en la movilidad espermática pero siendo todavía muestras con características aptas para ser utilizadas (Góngora y col, 2003).

Se han descrito casos de la utilización de muestras de semen criopreservadas durante 21 y 28 años, obteniendo bebés nacidos vivos (Horne y col, 2004; Feldschuh y col, 2005; Clark y col, 2006).

Por otra parte, utilizar muestras de donante ha tenido resultados favorables como los descritos por Góngora (2006); observo el incremento del índice de embarazo al utilizar muestras de donante (congeladas) en comparación al empleo de muestras de pacientes (frescas) con alguna alteración espermática (**oligozoospermia**, **astenozoospermia**, **hipospermia**) en TRA de baja complejidad.

Los bancos de semen deben llevar un control respecto a la fertilidad de sus donantes que incluya fecundaciones, embarazos, abortos e hijos vivos, ya que el número máximo de hijos vivos provenientes del semen del mismo donante, incluyendo los suyos, no deberá exceder a seis según lo referido en la ley, sin embargo en aquellos países donde no existe una legislación en dicho ámbito, pueden basarse en las leyes de otros países como la española (Ley 14/2006). La finalidad de esta regulación es evitar la consanguinidad inadvertida y mantener una variabilidad genética entre la especie (Pardo, 1994; Gijón, 2009).

5. Criopreservación de espermatozoides humanos

Por medio de la criopreservación es posible mantener la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo, de manera que su potencial de fecundación se conserve. Por otra parte la criobiología se encarga de entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares (Stornelli y col, 2005; Avila-Portillo y col, 2006).

Existen diferentes métodos de criopreservación que se pueden clasificar con base en la velocidad de congelamiento y descongelamiento en protocolos de congelación y descongelación lenta, congelación lenta con descongelación rápida en las cuales la adición del crioprotector suele realizarse por etapas y el descenso de la temperatura es gradual. La descongelación rápida se realiza a temperatura ambiente o en baño María a 30°C para evitar la recristalización. Trouson en 1986 describió la congelación ultrarrápida para embriones, la cual implica la rápida deshidratación celular utilizando altas concentraciones de crioprotector seguida de la inmersión en nitrógeno líquido (Ávila-Portillo y col, 2006). Se pueden utilizar diferentes recipientes para envasar y almacenar las muestras (Cuadro IV).

Cuadro IV. Recipientes para envasar

Recipientes de Congelación	Ventajas	Inconvenientes
Crio tubo	Mayor estabilidad térmica Sistema de identificación más claro Fácil sistema de cerrado; cierre casi hermético Flotabilidad	Mayor necesidad de espacio Velocidad de congelación y descongelación no uniforme Precio alto
Gobelet	Sistema de identificación más claro	Contacto de nitrógeno con la muestra Sistema de cerrado no hermético Mayor necesidad de espacio
Pajuela	Menor necesidad de espacio para almacenar Velocidad de descongelación más uniforme Rápida descongelación	Mayor sensibilidad a los cambios de temperatura Escape en el sellado de las pajuelas Identificación dificultosa Sensibilidad a la manipulación
Ampolla	Sistema de cerrado automático Suficiente aislamiento de la muestra	Fragilidad Necesidad de gran espacio de almacenamiento Pérdida de muestra al descongelar Temperatura de congelación poco controlable Aparataje específico

Tomado de Campos y col, 2008.

Factores que afectan la criopreservación de espermatozoides

Dentro de las células se llevan a cabo eventos moleculares en un medio acuoso líquido constituido por agua que a bajas temperaturas pasa de estado líquido a sólido, formando hielo y poniendo fin a las actividades biológicas celulares. Si la célula es capaz de mantener su viabilidad al ser descongelada, dicha célula tiene la capacidad para ser conservada a bajas temperaturas. Los procesos de criopreservación dependen de la naturaleza de la célula, contenido de agua intracelular, velocidad y grado de deshidratación, concentración de solutos del medio extracelular, velocidad de congelación, temperatura de almacenamiento y velocidad de descongelación. Todos estos factores influyen en mayor o menor medida sobre la supervivencia celular posterior a la descongelación (Ávila-Portillo y col, 2006; Fernández y col, 2009).

Velocidad de congelación

La variación térmica que sufre el espermatozoide desde la temperatura ambiente hasta los -196°C es considerable. Los puntos cruciales de esta transición térmica es el choque por frío y daño de enfriamiento (37°C a 0°C), formación de hielo y calor latente de fusión (0°C a -132°C). La velocidad de congelación se ajusta a estos puntos críticos que pueden dañar al espermatozoide (Pardo, 1994).

Choque por frío y daño de enfriamiento (37°C a 0°C)

El choque por frío es el daño celular debido a la sensibilidad frente a la velocidad de enfriamiento y es causado por efectos de transición en la fase lipídica. El daño de enfriamiento es el daño debido a la sensibilidad frente a una temperatura en particular o un rango de temperaturas (Watson, 1995).

Los ácidos grasos que conforman la membrana plasmática pueden existir en un estado rígido ordenado (gel) o uno más flexible y relativamente desordenado (fluido); la transición de un estado al otro se da en un rango de temperaturas, cuya media se conoce como temperatura de transición de fase, la cual será mayor o menor dependiendo de la composición de los ácidos grasos de dicha membrana. La transición de fase no se da simultáneamente en todos los fosfolípidos de la membrana y por lo tanto se espera la coexistencia de dominios en estado fluido y gel; esta situación ocasiona alteraciones físicas en la membrana plasmática por la inducción de fallos del empaquetamiento de lípidos que está asociada a una mayor pérdida de solutos a través de ésta (Drobnis y col, 1993).

Formación de hielo intracelular (0°C a -132°C)

La existencia de solutos en el agua produce un descenso del punto de congelación (**punto crioscópico**) entre -5°C y -10°C y en consecuencia la cristalización del agua se produce a temperaturas menores del punto de congelación del agua pura (0°C). Por lo tanto al disminuir la temperatura se produce un sobreenfriamiento de la muestra y el comienzo del proceso de formación de hielo depende de la probabilidad de formación de un punto de enucleación (punto de inicio de un conjunto de cristales de hielo). Cuanto mayor sea la diferencia entre la temperatura a la que comienza a formarse hielo y la temperatura de cambio de fase, mayor será la velocidad de crecimiento de los cristales de hielo. La manera en la que este hielo daña a la célula no es del todo conocida, pero se especula que se debe a

una disfunción de origen mecánico de las propiedades de la membrana celular y de otras estructuras celulares suspendidas en su interior, como pueden ser organelos celulares o grandes macromoléculas de proteínas. Cuanto mayor sea la cantidad de hielo formado dentro de la célula, menor es la esperanza de sobrevivencia celular (Fernández y col, 2009).

Calor latente de fusión

Al congelarse el medio de congelación se libera calor por la formación de cristales (calor latente de fusión) que provoca un considerable aumento de la temperatura y como consecuencia la temperatura de las células no disminuye paralelamente con la del dispositivo de congelación. De hecho, la temperatura de la muestra puede permanecer estática durante 2 ó 3 minutos antes de reanudarse el enfriamiento (Fernández y col, 2009).

Algunos estudios han observado que dicho periodo entre la formación de hielo y la reanudación del enfriamiento, llamado punto de congelación meseta es perjudicial para la supervivencia celular (Fuller y Paynter, 2004).

Estrés osmótico

Las células poseen volumen osmóticamente activo e inactivo, el primero se refiere al agua donde se encuentran suspendidos los organelos y que puede salir de la célula; el segundo comprende el agua que no abandona a la célula debido a que se encuentra asociada a macromoléculas y diferentes organelos. El volumen osmóticamente activo está involucrado en los procesos de hidratación y deshidratación celular producidos por alteraciones del gradiente osmótico (Fernández y col, 2009)

El estrés osmótico es un mecanismo activo a bajas velocidades de enfriamiento y está relacionado con la deformación mecánica de la célula, debido a la reducción de tamaño originada por el intenso proceso de deshidratación y la prolongada exposición de la célula a elevadas concentraciones de electrolitos, existen dos hipótesis complementarias que explican el fenómeno de estrés osmótico durante la criopreservación (Stornelli y col, 2005, Fernández y col, 2009).

La primera hipótesis (altas concentraciones de iones) atribuye a las interacciones de las proteínas de membrana con las altas concentraciones de iones alcanzadas en el medio extracelular, lo que provocaría la desnaturalización de las proteínas mediante la formación de puentes disulfuro entre aminoácidos (Fernández y col, 2009).

La segunda hipótesis (volumen celular mínimo) se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por deshidratación, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán lesiones irreversibles en su permeabilidad y la pérdida de lípidos en ésta, ocasionando la degeneración de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Fernández y col, 2009).

Recristalización

El agua en estado líquido al enfriarse va formando cristales, dicha formación no es homogénea, por lo tanto existe al mismo tiempo en estado líquido y sólido; el agua en estado líquido se va haciendo cada vez más viscosa hasta que alcanza los -132°C , en donde es tan viscosa que no puede convertirse en cristal denominándose a esa fase estado vítreo. La transición de una solución acuosa congelada a estado vítreo no ocurre repentinamente a -132°C , sino que es un fenómeno progresivo entre esta temperatura y -90°C , por lo que en una célula congelada a -196°C que pasa a -80°C , algunas de sus moléculas de agua vuelven a estado líquido que pueden convertirse en cristales provocando pequeños daños de recristalización. El problema es que estos pequeños daños son acumulativos y cada evento de calentamiento que se produzca por encima de -132°C contribuirá a disminuir la supervivencia funcional de las células criopreservadas (Fernández y col, 2009).

Agentes crioprotectores

Los agentes crioprotectores (ACP) son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el **punto eutéctico** de una solución determinada. El descenso del punto eutéctico implica el alcanzar una concentración dada de solutos a una temperatura menor de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento en que el espacio extracelular se congele (Fernández y col, 2009).

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa) y el dimetilsulfóxido. Sin embargo los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular (Ávila-Portillo y col, 2006).

ACP penetrantes

Son sustancias de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana; su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento. Su bajo peso molecular les permite la entrada rápida a través de la membrana celular, modular la estabilidad y fases de la bicapa de fosfolípidos así como también interferir en los procesos de **solvatación** del agua. Los más utilizados son 1,2-propanodiol, dimetilsulfóxido, etilen-glicol y glicerol. Todas las moléculas de estos compuestos son pequeñas y de peso molecular relativamente bajo. Dentro de este grupo el glicerol con un peso molecular de 92.09 g/mol es el más usado en la criopreservación espermática (Ávila-Portillo y col, 2006, Fernández y col, 2009).

ACP no penetrantes

Son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades rápidas de congelación. El tamaño de estas moléculas es muy superior a la de los ACP no penetrantes; por ejemplo el peso molecular de la sacarosa es 342 g/mol . Ejercen su acción crioprotectora actuando como tampón osmótico y promoviendo la rápida deshidratación

celular, suelen usarse asociados a los ACP penetrantes. Los más utilizados son sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinilpirrolidona, dextrano y polietilen-glicol, de los cuales la sacarosa y glucosa son los más usados en congelación de semen humano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad del agua a una magnitud mucho mayor de la que se predeciría por su concentración molar (Ávila-Portillo y col, 2006; Fernández y col, 2009).

Beneficios de los ACP

Los ACP protegen a los espermatozoides de los efectos adversos generados durante la criopreservación, uno de estos efectos es la elevada concentración de solutos durante las últimas etapas de la deshidratación celular, cuya protección se logra por la disolución de los electrolitos por parte de los ACP. Dicho efecto establece que en un sistema de dos fases, como agua líquida y hielo a una presión dada la concentración total de solutos en la fase líquida es constante a determinada temperatura, pero al irse solidificando en hielo la solución líquida restante contendrá progresivamente mayor concentración de ACP que de electrolitos, limitando así su toxicidad (Fernández y col, 2009).

Los ACP disminuyen la concentración de agua al intercalarse en el medio más moléculas de crioprotector que de agua; los cristales de hielo en crecimiento tienen mayor dificultad para encontrar moléculas de agua y seguir creciendo por lo tanto se reduce el riesgo de muerte celular (Fernández y col, 2009).

El adicionar sustancias crioprotectoras al medio intracelular ocasiona un aumento en la viscosidad, reduciendo la movilidad de las moléculas dentro de su seno y evitando la formación de cristales de hielo. Por último el añadir un soluto (ACP) a un disolvente (medio de congelación) desciende el punto crioscópico de la solución, requiriéndose una temperatura más baja para el cambio de fase. Por lo tanto, las células experimentan menos estrés osmótico que si estuvieran bajo las mismas condiciones sin ACP. Este efecto impide el establecimiento crítico de altas concentraciones de solutos en la fracción residual de congelación hasta que el sistema llegue a temperaturas muy bajas donde toda la actividad molecular es inhibida (Fernández y col, 2009).

Aspectos perjudiciales de los ACP

La utilización de ACP tiene efectos protectores sobre los espermatozoides ante el proceso de criopreservación. Sin embargo los ACP son sustancias químicas que no se encuentran en el interior de las células bajo condiciones normales. Por lo que realmente están ocasionando es envenenar a la célula cuando penetran su membrana y se difunden en el medio intracelular, pero como el metabolismo celular es muy rápido se ve muy disminuida la acción tóxica de los ACP, exceptuando que se empleen concentraciones muy altas a temperaturas relativamente elevadas (alrededor de los 0°C) (Watson, 1995; Stornelli y col, 2005).

Los ACP ejercen estrés osmótico sobre las células debido a que aumenta la osmolaridad del medio; inicialmente las células se deshidratan para compensar la fuerza que induce la presencia de los ACP y posteriormente se hidratan al mismo tiempo que el agua junto con los ACP penetran el interior celular, pero los ACP lo hacen más lentamente que el agua,

debido a que la membrana tiene un mayor coeficiente de permeabilidad al agua que a los ACP, finalmente la célula regresa a su estado **isotónico** normal (Stornelli y col, 2005).

Durante el proceso de eliminación de los ACP por disolución de la muestra posterior a la congelación, el agua entra rápidamente a las células debido al gradiente osmótico que se genera mientras que los ACP salen de la célula lentamente, lo que ocasiona que las células se hinchen antes de alcanzar el equilibrio. Estos cambios en el volumen de las células (contracción e hinchazón) pueden ser bastante considerables como para causar daño celular irreversible (Watson, 1995; Fernández y col, 2009).

Los espermatozoides contienen muy poca agua y gran parte de ésta corresponde a su volumen osmóticamente inactivo (45-75%). En particular los espermatozoides humanos pueden hincharse solo el 110% de su volumen isotónico original, mientras que pueden disminuir el 75% de su volumen. Por lo tanto, éstos toleran más un encogimiento que una fuerte hinchazón debido a que su conformación está diseñada para proteger al núcleo donde se encuentra almacenado el ADN (Fernández y col, 2009).

6. Ácido desoxirribonucleico

El ADN está formado por subunidades denominadas nucleótidos, constituidos a su vez por un azúcar desoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada, ésta última puede ser adenina y guanina (purinas) o timina y citosina (pirimidinas). Las uniones entre guanina y citosina se realizan con tres puentes de hidrógeno mientras que la adenina y timina lo hacen mediante dos, por lo tanto, entre más pares de guanina y citosina existan más estable será la molécula. Lo que determina la diferencia entre los nucleótidos es la base nitrogenada que contengan, ya que el azúcar siempre es la misma (Figura 8) (Pérez, 2007, Klug y col, 2012).

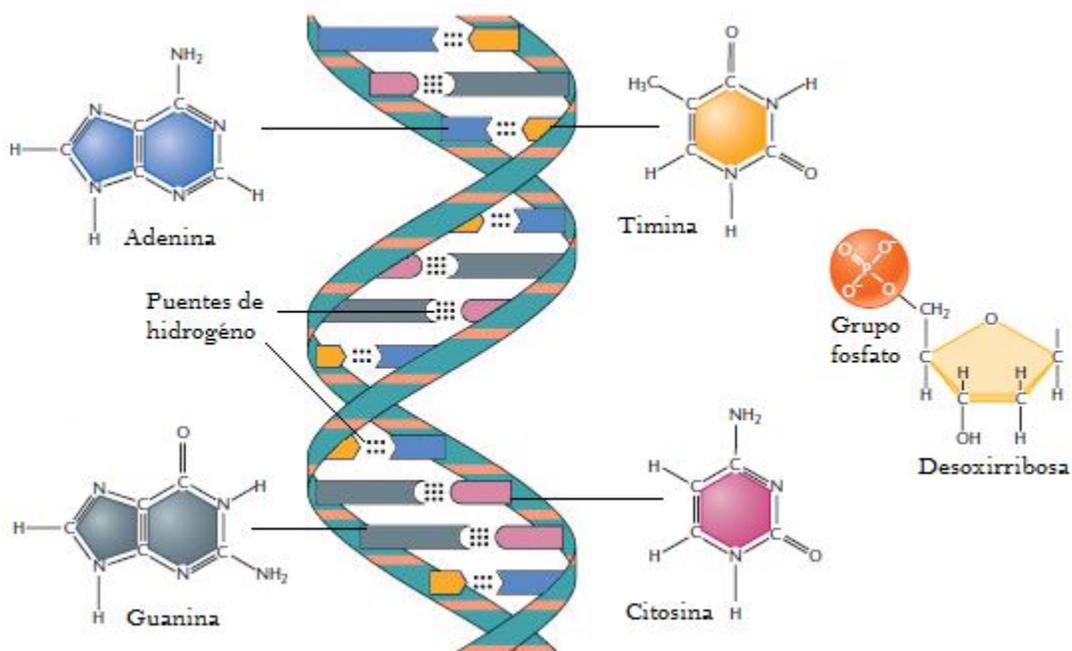


Figura 8. Ácido desoxirribonucleico (modificado de Klug y col, 2012).

Los nucleótidos forman dos cadenas complementarias entre si y presentan una estructura en escalera o helicoidal, donde las bandas laterales están constituidas por los azúcares unidos por los grupos fosfatos mientras que los escalones están formados por pares de bases nitrogenadas, en donde la adenina solo tiene afinidad por la timina y la guanina por la citosina, por lo tanto, si se conoce un lado de la escalera se puede predecir el otro (Figura 8). Esta molécula se encarga de la transmisión, expresión y conservación de la información genética que se encuentra almacenada en ella, dicha información es necesaria para la íntegra formación de un organismo que pueda cumplir con sus funciones biológicas de acuerdo a cada especie (Bloomfield y col, 2000).

Organización del ADN en el espermatozoide

Durante la espermiogénesis las espermatídes experimentan cambios morfológicos considerables que dan lugar a los espermatozoides. Entre estos cambios está la compactación de la cromatina dentro del núcleo a través de un complejo proceso de empaquetamiento del ADN, en donde las histonas son remplazadas por proteínas de transición y éstas a su vez por protaminas (Wykes y Krawetz, 2003; Shamsi y col, 2008).

Las protaminas son proteínas de carácter básico y bajo peso molecular (5000 Da), constituidas principalmente por residuos de arginina (del 55 al 79%) que permiten una fuerte unión con el ADN, también contienen cantidades considerables de residuos de cisteína que estabilizan la cromatina espermática por la formación de múltiples enlaces disulfuro entre las protaminas durante las últimas etapas de maduración nuclear (Fuentes-Mascorro y col, 2000).

Existen dos tipos de protaminas dentro del espermatozoide humano, la protamina 1 (P1) y la protamina 2 (P2). Las cantidades de protaminas entre los espermatozoides de mamíferos son relativamente constantes. Sin embargo, la proporción relativa de cada protamina es variable, por ejemplo se ha observado que la relación entre la P2 en el hombre, ratón y hámster constituye el 67, 34 y 43% del total de protaminas. Cabe señalar que la proporción anormal de P1 y P2 está asociada con problemas de fertilidad humana (Wykes y Krawetz, 2003; Erenpreiss y col, 2006).

Adicionalmente a las protaminas el hombre retiene un porcentaje de histonas dentro de su cromatina espermática. El ADN en la cromatina espermática humana se encuentra dividido por fracciones, un 15% del ADN está confinado por histonas y el otro 85% por protaminas. Dicha retención del 15% de histonas que son menos estables que las protaminas conducen a la formación de una estructura menos condensada de la cromatina (Wykes y Krawetz, 2003; Erenpreiss y col, 2006).

El ADN de las células germinales haploides masculinas está empaquetado en un volumen aproximadamente 40 veces menor que el de las células somáticas. Para lograr este estado único condensado el ADN espermático está organizado de una forma específica que difiere sustancialmente de las células somáticas, cuya cromatina se encuentra empaquetada dentro de nucleosomas, estructuras formadas a partir de un núcleo proteico constituido por un octámero de histonas rodeado por dos vueltas de ADN bicatenario (200 pb); los

nucleosomas a su vez forman una hélice regular llamada solenoide (Figura 9) (Fuentes-Mascorro y col, 2000; Miller y col, 2010).

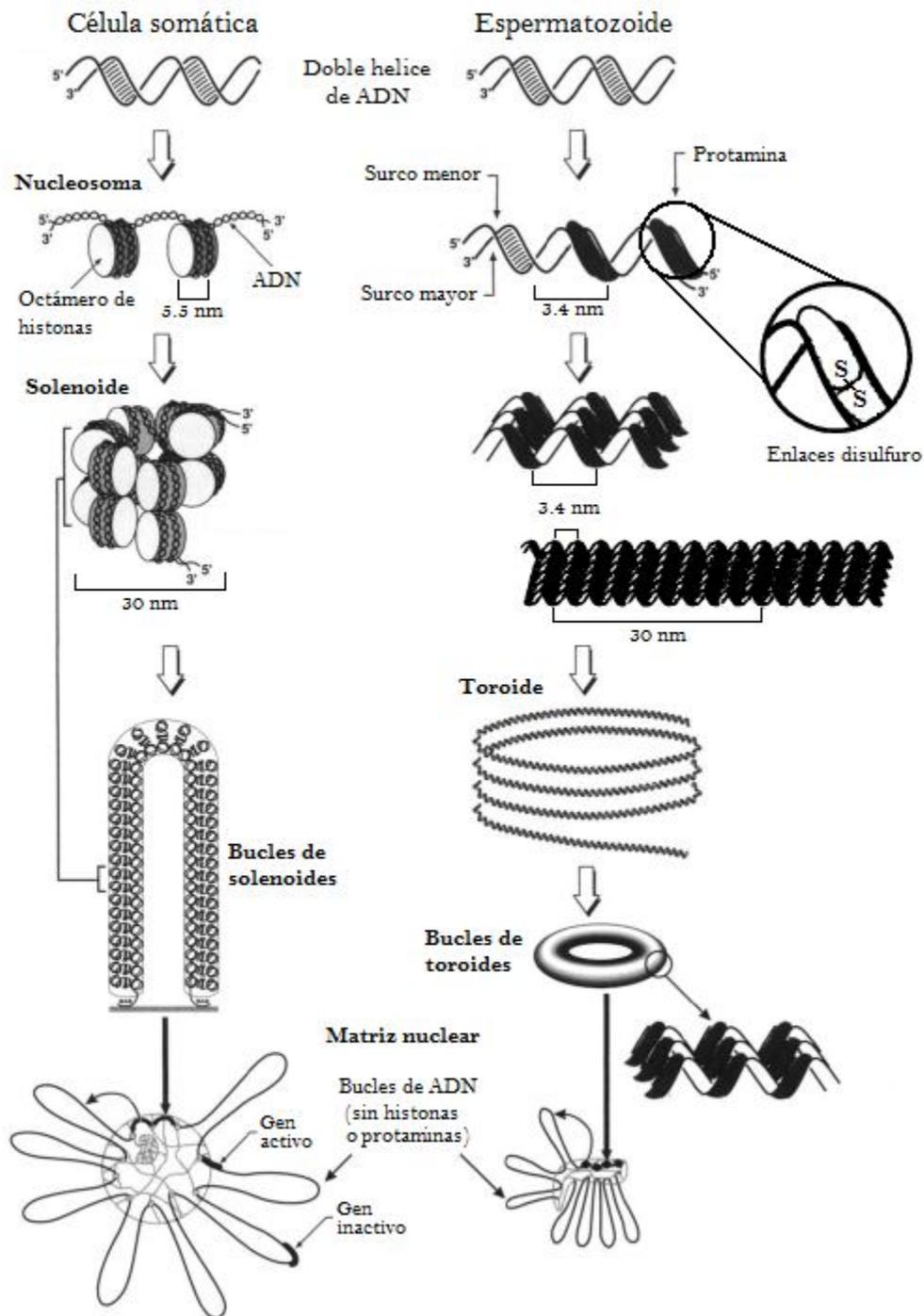


Figura 9. Organización del ADN en la célula somática y el espermatozoide de ratón (modificado de Ward y Coffey, 1991; Ward, 1993).

En el espermatozoide las protaminas se intercalan entre los surcos menores de la doble cadena de ADN, a su vez estos complejos de protamina-ADN se intercalan entre los surcos mayores de una doble cadena de ADN vecina, por lo tanto las hebras de ADN en el núcleo están empaquetadas lado a lado en una matriz lineal, permitiendo la organización de la cromatina en un estado único de compactación (Figura 9) (Ward y Coffey, 1991).

La unidad fundamental de embalaje de la cromatina espermática en los mamíferos es una estructura denominada toroide que contiene entre 50 y 60 kilobases de ADN. Los toroides se encuentran unidos entre sí por ADN desenrollado y extendido; contienen el ADN en dominios de bucles altamente condensados por protaminas y fijados a la matriz nuclear; dichos toroides están estabilizados por enlaces disulfuro formados por la oxidación de los grupos sulfhidrilo de la cisteína presente en las protaminas (Figura 9). Así cada cromosoma representa una guirnalda de toroides y los 23 cromosomas están agrupados por un centrómero compacto bien posicionado dentro del núcleo con los extremos de los **telómeros** unidos a proteínas y expuestos a la periferia nuclear (Ward, 1993; Erenpreiss y col, 2006).

Esta organización altamente condensada, insoluble y compacta de la cromatina espermática le brinda gran estabilidad y protección al material genético paterno durante su transporte a través del tracto reproductor masculino y femenino, asegurando que el genoma paterno y materno se reorganicen adecuadamente para iniciar la formación de un nuevo organismo (Erenpreiss y col, 2006; Shamsi y col, 2008).

Fragmentación del ADN

La fragmentación del ADN es un tipo de daño que se caracteriza por las rupturas tanto de cadena sencilla como de doble cadena en esta molécula, las cuales impiden la íntegra transmisión de la información genética y es particularmente frecuente en los espermatozoides de hombres subfértiles. Algunas causas externas que provocan la fragmentación del ADN en los espermatozoides son el tabaquismo, temperatura testicular elevada; entre las patológicas se encuentran la criptorquidia, varicocele, cáncer, episodios febriles y estrés entre otras. Para determinar el grado de fragmentación del ADN se utiliza el índice de fragmentación del ADN (**DFI** de sus siglas en inglés DNA fragmentation index) (Morales y col, 2007).

Mecanismos de fragmentación del ADN

Los mecanismos por los cuales se genera la fragmentación del ADN en los espermatozoides no son completamente conocidos, entre los más estudiados son el estrés oxidante, apoptosis, deficiencia de procesos naturales de recombinación genética y el empaquetamiento de la cromatina que implican la inducción de rupturas en la cadena del ADN (Aitken y Krausz, 2001).

Estrés oxidante

El estrés oxidante se debe principalmente a la presencia excesiva de ERO, dentro de éstas se encuentran los radicales libres que poseen al menos un electrón libre

haciéndolos muy reactivos. Son generados por espermatozoides inmaduros y células que se encuentran en el plasma seminal, otras posibles causas incluyen el ciclo redox de **xenobióticos**, agotamiento de antioxidantes y apoptosis (Cocuzza y col, 2007).

Los espermatozoides humanos son susceptibles al estrés oxidante debido a que sus membranas plasmáticas se componen por ácidos grasos insaturados, principalmente por el ácido docosahexaenoico con seis dobles enlaces por molécula. Estos ácidos grasos insaturados brindan a la membrana plasmática cierta fluidez, la cual es esencial al momento de la fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el óvulo. Las ERO rompen estos enlaces asociados a los ácidos grasos insaturados y se inicia una reacción en cadena de la peroxidación lipídica que reduce el contenido de ácidos grasos en la membrana plasmática, afectando su fluidez. El estrés oxidante induce fragmentación del ADN nuclear y mitocondrial, alterando la capacidad fecundante de los espermatozoides (Twigg y col, 1998; Tortolero y col, 2005).

Se ha mostrado que la presencia de leucocitos en el plasma seminal afectan el balance entre los factores que favorecen y los que previenen el estrés oxidante (Quintero y col, 2000). Por otra parte se ha observado que cuando los parámetros seminales son normales la presencia de leucocitos en plasma seminal no afecta la integridad del ADN a comparación de cuando presentan alteraciones morfológicas y de movilidad (Erenpreiss y col, 2002).

Smith y col (2006) mostraron que muestras seminales de pacientes con varicocele presentaron mayor daño al ADN espermático. Dicho daño puede estar mediado por el estrés oxidante al mostrar los autores la correlación positiva entre los niveles de ERO y DFI.

Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que involucra una serie de eventos bioquímicos, los cuales desencadenan alteraciones morfológicas celulares que eventualmente conducen a la muerte celular. En células somáticas los cambios apoptóticos se caracterizan por la activación de caspasas, externalización de la fosfatidilserina, fragmentación del ADN, condensación de la cromatina, elongación de las mitocondrias y cambios irregulares de la membrana plasmática mientras que en los espermatozoides no ha sido completamente caracterizado dicho mecanismo; algunos de los marcadores que también se han observado en espermatozoides son la activación de caspasas, externalización de la fosfatidilserina y la fragmentación del ADN (Said y col, 2010).

La apoptosis en células germinales se encarga de regular su proliferación en fases tempranas y evitar las formas anormales de espermatozoides que resulta en la eliminación de hasta el 75% de éstos (Zini y Libman, 2006).

La razón por la cual los espermatozoides tienen que someterse a una regulación programada de muerte antes del coito se debe a que después de la inseminación, el

tracto reproductor femenino responde a la presencia de millones de espermatozoides muertos y moribundos con el desencadenamiento masivo de leucocitos que se encargan de fagocitar a dichos espermatozoides, sí este mecanismo no se lleva de manera eficiente puede provocar un estallido oxidante que afectaría a los demás espermatozoides por la producción de citocinas proinflamatorias (Aitken y Kooppers, 2011).

La apoptosis impide la participación de espermatozoides con alteraciones genéticas en el proceso de fertilización. Sin embargo este mecanismo preventivo no es perfecto, por lo tanto, algunos espermatozoides con alteraciones genéticas pueden escapar de él y llegar a fecundar al ovulo, lo que conllevaría al desarrollo embrionario anormal (Aitken y Kooppers, 2011).

Empaquetamiento defectuoso de la cromatina espermática

En el transcurso de la espermiogénesis se lleva a cabo el remodelamiento de la cromatina dentro del núcleo condensado de las espermátides. Este remodelamiento consiste en la sustitución de histonas por proteínas de transición y éstas a su vez por protaminas que incrementan la estabilidad del genoma paterno. Se ha postulado que este remodelamiento estructural de la cromatina está mediado por la actividad de la topoisomerasa II (endonucleasa endógena) que crea y liga cortes en la cadena del ADN para proporcionar el giro necesario y mitigar el estrés de torsión durante la protaminosis. Por lo tanto cualquier perturbación o anomalía durante este proceso puede conducir a la persistencia de cortes endógenos en la cadena del ADN espermático (Agarwal y Said, 2003; Marcon y Boissonneault, 2004).

Se afirma que la recombinación genética que toma lugar durante la meiosis, está asociada con la introducción genéticamente programada de roturas en la doble cadena de ADN por nucleasas de la familia **SPO11**. Normalmente el control de la recombinación durante la profase meiótica no permite la división hasta que las roturas del ADN sean plenamente reparadas. Pero el control defectuoso puede dejar sin reparar dichas roturas (Erenpreiss y col, 2006).

Se ha mostrado que la presencia del precursor de la P2 en hombres infértiles se correlaciona negativamente con la concentración, morfología y motilidad espermática normal; positivamente con la relación de los niveles de P1 y P2 y con la integridad del ADN (Torregrosa y col, 2006).

En algunos hombres infértiles se ha observado la presencia de mutaciones en los genes codificantes de protaminas. Por otra parte se ha mostrado que ratones transgénicos con defectos en la expresión de protaminas presentan alteraciones estructurales en el núcleo espermático con grados variables de infertilidad (Oliva, 2006).

Mediante la técnica de PCR se han analizado los niveles de transcripción remanentes de las P1 y P2 en espermatozoides maduros de donadores y pacientes astenozoospermicos, estos últimos presentaron niveles bajos de transcripción de P1 y P2 (Kempisty y col, 2007).

Efectos de la fragmentación del ADN sobre la fertilidad masculina

Aquellas parejas en donde el hombre presenta un elevado porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado tienen baja probabilidad de lograr el embarazo de forma natural (Zini y Libman, 2006).

Evenson y col (2002) observaron que la probabilidad de fertilización *in vivo* es próxima a cero cuando la proporción de células espermáticas con ADN fragmentado excede el 30% y a partir de esta observación establecen en la especie humana que el DFI mayor al 30% representa un bajo potencial de fertilidad; moderado de 25 a 30%, leve de 15 a 24% y excelente cuando el DFI es menor del 15%.

Por otra parte Sergerie y col (2005), a partir de la comparación entre los resultados de la fragmentación del ADN espermático de hombres con fertilidad comprobada y pacientes infértiles, establecen un punto de corte del 20% de espermatozoides con ADN fragmentado para discriminar entre hombres fértiles e infértiles.

En parejas sin estudios previos de fertilidad se observó que la probabilidad de embarazo declinó en función del porcentaje de espermatozoides con daño del ADN y cuando éste sobrepasó el 40%, la obtención del embarazo fue mínima (Spano y col, 2000).

Fragmentación del ADN y su relación con los parámetros seminales

La posible relación entre la fragmentación del ADN y los parámetros convencionales del semen (concentración, movilidad y morfología entre otros) es un tema de estudio y discusión por varios autores. Algunos reportan la correlación negativa entre la movilidad, concentración y morfología de los espermatozoides con la fragmentación del ADN (Benchaib y col, 2003; Borini y col, 2006), mientras que otros estudios no muestran ninguna correlación (Zini y col, 2005).

Dorado y col (2008) observaron que muestras seminales de pacientes con alteraciones de concentración, movilidad y sus diferentes combinaciones presentaron más del 30% de fragmentación del ADN. No observaron este aumento de la fragmentación en pacientes con morfología alterada, siempre y cuando ésta no se presentó en combinación con las otras alteraciones.

Fragmentación del ADN espermático y las técnicas de reproducción asistida

Se considera que la fragmentación del ADN espermático es causa importante de infertilidad masculina y ha despertado particular interés debido al riesgo que implica la transmisión de defectos genéticos a la descendencia, especialmente cuando se utilizan TRA donde no es posible saber si los espermatozoides empleados tienen o no fragmentado su ADN (Góngora y Fontanilla, 2010). En procedimientos de ICSI existe gran probabilidad de emplear espermatozoides con movilidad y morfología normal que presenten ADN fragmentado (Agarwal y Said, 2003). Debido a esto se han realizado estudios para analizar la relación entre el grado de lesión del ADN espermático con varias tasas e índices de fertilidad (Agarwal y Allamaneni, 2005).

Benchaib y col (2003) observaron en procedimientos de FIV e ICSI de pacientes, el aumento de la tasa de fecundación y desarrollo embrionario cuando la fragmentación del ADN espermático no excedía el 10%; también observaron que una alta proporción de espermatozoides con daño del ADN es un factor peyorativo para obtener embarazos por ICSI. Por otra parte Borini y col, (2006) observaron que pacientes con elevados niveles de fragmentación del ADN espermático presentaron mayor número de abortos posterior a ICSI que pacientes con bajos niveles de ADN fragmentado; en procedimientos de FIV no observaron dicha diferencia.

Pacientes con diferentes grados de daño del ADN espermático no mostraron diferencias significativas en las tasas de fertilización, embarazo y aborto posterior a ICSI (Zini y col, 2005).

En procedimientos de IA, se observó en aquellas parejas que lograron el embarazo, bajos porcentajes de fragmentación de ADN espermático en comparación con las parejas que no obtuvieron embarazos (Duran y col, 2002).

Técnicas para evaluar la fragmentación del ADN

El núcleo del espermatozoide es una estructura muy estable, rígida, de naturaleza paracristalina y muy difícil de desorganizar. Por lo tanto, las técnicas que se encargan del estudio del ADN espermático deberán traspasar esta barrera física (Gosálvez y col, 2007).

Existen diferentes técnicas para evaluar la fragmentación del ADN en el espermatozoide, éstas se dividen en dos grupos. En primer lugar se encuentran aquellas que evalúan la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diferentes tratamientos tales como el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA de sus siglas en inglés sperm chromatin structure assay), la detección de las roturas por fluorescencia mediante hibridación *in situ* del ADN (DBD-FISH de sus siglas en inglés DNA breakage detection-fluorescence *in situ* hybridization), el ensayo cometa bajo condiciones desnaturalizantes y la técnica de la dispersión de la cromatina espermática (SCD de sus siglas en inglés sperm chromatin dispersión) (Cuadro V) (Morales y col, 2007; Gosálvez y col, 2007).

En el segundo grupo se incluyen las técnicas que marcan las roturas en la cadena de ADN, tanto de cadena sencilla como doble; por medio de procesos enzimáticos *in situ* incorporan nucleótidos marcados en los extremos de las roturas como la marcación de los extremos de las roturas por nucleótidos terminales, (TUNEL de sus siglas en inglés terminal dUTP nick-end labeling) y la traducción de las roturas *in situ* (ISNT de sus siglas en inglés *in situ* nick translation) (Cuadro V) (Morales y col, 2007; Gosálvez y col, 2007).

Cuadro V. Técnicas para evaluar la fragmentación del ADN

Técnica	Fundamento	Ventajas	Desventajas
SCSA	Se basa en la susceptibilidad del ADN para ser desnaturalizado por medio de soluciones ácidas y las propiedades metacromáticas del naranja de acridina para discriminar entre roturas de cadena doble o sencilla al intercalarse entre la cadena de ADN.	Punto de corte establecido (30%) para diferenciar de hombres fértiles e infértiles.	Equipo sofisticado y costoso. Capacitación técnica. La objetividad radica del observador.
DBD-FISH	Se basa en la capacidad de soluciones alcalinas para desnaturalizar el ADN a partir de los extremos con roturas de cadena doble y sencilla y la hibridación de dichas roturas con nucleótidos marcados con algún fluorocromo.	Revela modificaciones estructurales de la cromatina. Permite evaluar daño de célula a célula, <i>in situ</i> y en secuencias específicas del ADN.	Procedimiento sofisticado y costoso. Requiere de personal especializado.
Cometa	Se fundamenta en la tasa de rapidez de migración de pequeños fragmentos de ADN hacia el ánodo de un campo de electroforesis en comparación con el ADN no fragmentado.	Bajo costo. Es sensible y requiere de pocas células para su análisis. Altamente reproducible.	Lenta ejecución. Requiere evaluador especializado.
SCD	Se fundamenta en base a la capacidad que tiene el ADN para ser desnaturalizado por tratamientos ácidos y su posterior desproteización que induce la relajación de bucles de ADN, los cuales se visualizan como halos en aquellos espermatozoides con ADN intacto.	Análisis simple de resultados. Pueden implementarse otras técnicas junto con esta, para analizar otros aspectos relacionados con la fragmentación del ADN.	
TUNEL	Se basa en la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos de la cadena de ADN que presentan roturas (3'-OH) tanto de cadena simple como doble por una transferasa terminal.	Simultáneamente puede detectar roturas de cadena sencilla y doble. Cumple con parámetros de control de calidad.	Equipo sofisticado y costoso Personal especializado. El daño celular no puede ser cuantificado. Niveles de marcaje intermedios e irregulares.
ISNT	Es una forma modificada del TUNEL, por lo cual el fundamento es el mismo, pero utiliza timidina marcada radioactivamente y es incorporada por la ADN polimerasa.	Identifica niveles variables y apreciables de daño del ADN endógeno. Reacción de marcaje directo.	Solo marca roturas de cadena sencilla y carece de sensibilidad. Personal especializado. Equipo sofisticado y costoso.

Elaborado a partir de Evenson y col, 2002; Fernández y col, 2003; Angelopoulou y col, 2007; Cortés-Gutiérrez y col, 2007; Gosálvez y col, 2007; Shamsi y col, 2008.

Técnica de la dispersión de la cromatina espermática

La técnica del SCD consiste en la inmersión de espermatozoides en una matriz de agarosa y son expuestos a soluciones de lisis para producir en ellos la desproteización del núcleo, que da como resultado la aparición de halos extendidos de ADN disperso, los cuales se monitorean utilizando fluorocromógenos específicos para ADN y siendo observados por microscopía de fluorescencia. Dichos halos corresponden a bucles de ADN adjuntos a la estructura nuclear residual; estos núcleos desproteinizados se denominan “**nucleoides**”. La presencia de roturas en el ADN no promueve la expansión de halos y es la base para

detectar daño en el ADN. Es decir, los espermatozoides con fragmentación del ADN no liberan bucles de ADN por lo tanto no muestran halo, mientras que los espermatozoides sin fragmentación muestran grandes halos que corresponden a la dispersión de bucles de ADN (Fernández y col, 2003).

La técnica del SCD es simple, rápida, exacta y altamente reproducible para el procesamiento de espermatozoides y el análisis de la fragmentación del ADN espermático. Por otra parte, tiene un tiempo de respuesta de menos de una hora, el costo del reactivo por muestra es bajo y permite el procesamiento simultáneo de varias muestras. La prueba SCD no requiere el uso de instrumentación compleja, puede ser llevado a cabo con el equipo disponible en un laboratorio de andrología y los criterios de valoración de la prueba pueden ser fácilmente evaluados sin requerir de una capacitación prolongada. Por lo tanto, puede ser potencialmente usado para la detección de la fragmentación del ADN espermático en los laboratorios de andrología como un examen clínico rutinario (Fernández y col, 2003).

A diferencia de las pruebas semicuantitativas actuales para la determinación de la fragmentación del ADN espermático (por ejemplo, TUNEL y el ensayo cometa), Esta técnica no se basa en la determinación de color o intensidad de fluorescencia. Si no que las muestras se observan bajo microscopía de campo claro o bien de fluorescencia, para determinar el porcentaje de espermatozoides que presenten o no halo disperso, cuya discriminación visual directa es muy clara y evidente (Figura 10). Además permite la discriminación entre espermatozoides completos y otros tipos celulares presentes en la muestra (Fernández y col, 2003; Gosálvez y col, 2007).

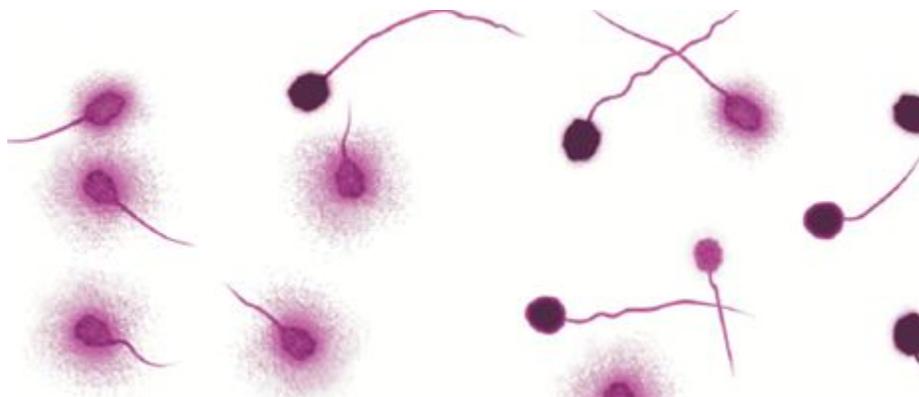


Figura 10. Dispersión de halos en espermatozoides (tomado de Halosperm®).

Chohan y col (2006) emplearon las técnicas de TUNEL, SCSA, SCD y naranja de acridina para determinar la fragmentación del ADN en muestras de semen de hombres infértiles y donantes; al comparar los resultados obtenidos por las diferentes técnicas encontraron una estrecha similitud entre los resultados del TUNEL, SCSA y SCD. Concluyeron que las técnicas de TUNEL, SCSA y SCD son herramientas diagnosticas sensibles para detectar fragmentación del ADN en los espermatozoides, mientras que los resultados obtenidos por naranja de acridina son cuestionables debido a la variabilidad de sus resultados en comparación con las demás técnicas.

III. Planteamiento del Problema

En el mundo hay aproximadamente 80 millones de parejas infértiles y alrededor del 50% de los casos se debe al factor masculino de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. En algunas parejas los espermatozoides no poseen las características necesarias para fecundar al ovocito y generar una gestación viable con un recién nacido sano. Por lo tanto, estas parejas o bien cualquier mujer que desee la concepción, recurren a los espermatozoides de donante como una alternativa para lograr el embarazo.

Por medio de la criopreservación se mantiene la capacidad fecundante de los espermatozoides hasta el momento de ser utilizados. Sin embargo, reportes han mostrado que el proceso de congelación y descongelación de la técnica de criopreservación aumenta la fragmentación del ADN de los espermatozoides, alterando su capacidad fecundante.

Debido a que las técnicas de reproducción asistida suprimen las barreras naturales de selección espermática, un espermatozoide con ADN fragmentado que presenta movilidad y morfología normal puede ser utilizado para fecundar al ovocito y disminuir la tasa de fertilización, división del embrión, implantación, embarazo y nacimientos logrados. Por lo anterior se decidió analizar el efecto de la criopreservación sobre el ADN de los espermatozoides de donante.

IV. Hipótesis

Si el proceso de congelación y descongelación del semen altera la integridad molecular del ADN de los espermatozoides, esta alteración se verá reflejada en el índice de fragmentación del ADN postcriopreservación.

V. Objetivos

Objetivo general

Analizar el efecto de la criopreservación sobre la fragmentación del ADN espermático en muestras de donante.

Objetivos particulares

- Evaluar los parámetros seminales antes (volumen, pH, vitalidad, concentración, movilidad y morfología) y después (concentración y volumen) de la criopreservación de muestras de donante.
- Estimar la fragmentación del ADN pre y postcriopreservación de muestras de donante.
- Analizar si existe correlación entre la movilidad y la fragmentación del ADN espermático.
- Establecer la posible relación entre la fragmentación del ADN espermático y los resultados de las técnicas de reproducción asistida de muestras de donante.

VI. Materiales y métodos

1. Recolección de la muestra

Las muestras seminales se obtuvieron de donadores del banco de semen del Instituto Valenciano de Infertilidad, México. Se pidió a los donadores que después de un periodo de abstinencia sexual (de tres a cinco días) depositaran su semen en recipientes estériles. Debido a que la primera fracción seminal contiene cerca del 50% del total de espermatozoides, cuando se llegó a perder alguna fracción del semen; la muestra no se analizó y se repitió el procedimiento con los mismos días de abstinencia. Después de que se obtuvieron las muestras se dejaron reposar dentro de una incubadora a 37C° por 30 minutos, tiempo necesario para su licuefacción y posterior análisis.

2. Seminograma

La finalidad del análisis seminal fue recabar información acerca del estado reproductivo de los donantes. Las características macroscópicas que se analizaron fueron la licuefacción, viscosidad, aspecto, volumen y pH. En cuanto al examen microscópico de las muestras se estimó la concentración, movilidad, vitalidad, aglutinación y morfología de los espermatozoides, además de la presencia de detritos y otros elementos celulares.

Examen macroscópico

Licuefacción y viscosidad

Las muestras normales de semen se deben licuar antes de 30 minutos a 37C°. En aquellas muestras que al finalizar este tiempo todavía no se había completado, se recurrió a licuarlo mecánicamente, haciendo pasar la muestra por una pipeta las veces necesarias para romper la viscosidad.

Aspecto

Aquí se tomaron aspectos como: color, opacidad, transparencia y la presencia de cuerpos mucosos o gelatinosos. El semen humano es normalmente un fluido homogéneo opalescente, de color blanquecino amarillento y puede contener gránulos gelatinosos que no licuan.

Volumen

El volumen del eyaculado se midió en un tubo graduado estéril. El volumen normal del eyaculado debe ser de 2 ml o mayor.

pH

El pH de las muestras se midió con tiras de papel ColorpHast (Merck; Dermstadt, Alemania). Se colocó una gota de semen sobre la tira de papel y después de 30 segundos, el color de la zona impregnada se comparó con la tira de calibración. El pH de las muestras normales de semen se debe encontrar en el rango de 7.2 a 8.2.

Examen microscópico

Concentración

Se colocaron 10 μ l de la muestra licuada sobre la cámara Makler (Sefi Medical Instrument; Haifa, Israel) (Figura 11). Esta cámara está diseñada especialmente para determinar la concentración y movilidad de espermatozoides, utilizando la muestra en fresco y sin diluir. Se observaron a través del microscopio de contraste de fases con objetivo de 20x y se contaron los espermatozoides de tres cuadros de la cámara. El resultado se multiplicó por 10 y se dividió entre 3, obteniendo así la concentración de espermatozoides por mililitro.



Figura 11. Cámara Mackler

Movilidad

El análisis de movilidad se realizó solamente con espermatozoides libres y nunca con los que se encontraron agregados entre sí, o con otras células. Se llevó a cabo el recuento de los espermatozoides móviles e inmóviles en varios campos tomados al azar con el objetivo de 20x; se cuantificaron 100 espermatozoides colocándolos en alguna clase de la siguiente clasificación:

- Clase a.- móviles progresivos rápidos: se desplazan de forma rectilínea y rápida.
- Clase b.- móviles progresivos lentos: se desplazan más lentamente de forma rectilínea o en curvas.
- Clase c.- móviles no progresivos: se mueven pero no se desplazan.
- Clase d.- inmóviles: no se mueven en absoluto.

El resultado de movilidad se representó con el porcentaje de espermatozoides de cada clase (a, b, c y d) (WHO, 1999).

Vitalidad espermática

La vitalidad espermática refleja a los espermatozoides que están vivos, que no siempre coincide con los que presentan movilidad. Para ello se utilizó la técnica de tinción vital que se basa en el principio de que las células muertas presentan daño en la membrana plasmática y por lo tanto absorberán determinadas tinciones, como la eosina.

Se mezclaron 5 μ l de semen fresco con 5 μ l de eosina al 0.5% y se colocaron sobre un portaobjetos, se taparon con un cubreobjetos y después de un minuto se observaron bajo el microscopio de contraste de fases con objetivo de 40x. Se contaron los espermatozoides teñidos (muertos) y no teñidos (vivos) hasta completar 100; el resultado se expresó en porcentaje.

Morfología

Para el estudio de la morfología se prepararon frotis, los cuales consistieron en colocar 10 μ l de semen sobre un portaobjetos y se extendieron con otro portaobjetos de aristas romas, se dejaron secar a temperatura ambiente.

Posteriormente se tiñeron con el equipo de tinción Hemacolor (Merck; Dermstadt, Alemania), el cual incluye una solución fijadora y dos colorantes que tiñen diferentes partes del espermatozoide. Las extensiones se dejaron pasar durante 50 segundos por cada uno de los tres reactivos de la tinción; al final se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

El análisis de los espermatozoides teñidos se realizó al microscopio de campo claro con el objetivo de 100x y utilizando aceite de inmersión, se cuantificaron 100 espermatozoides. Sólo las formas reconocibles se tomaron en cuenta, descartando los espermatozoides mal teñidos, incompletos y las células inmaduras. Se aplicó estricto criterio de Kruger, criterio más rígido para la interpretación morfológica espermática (Figura 12) (WHO, 1999).

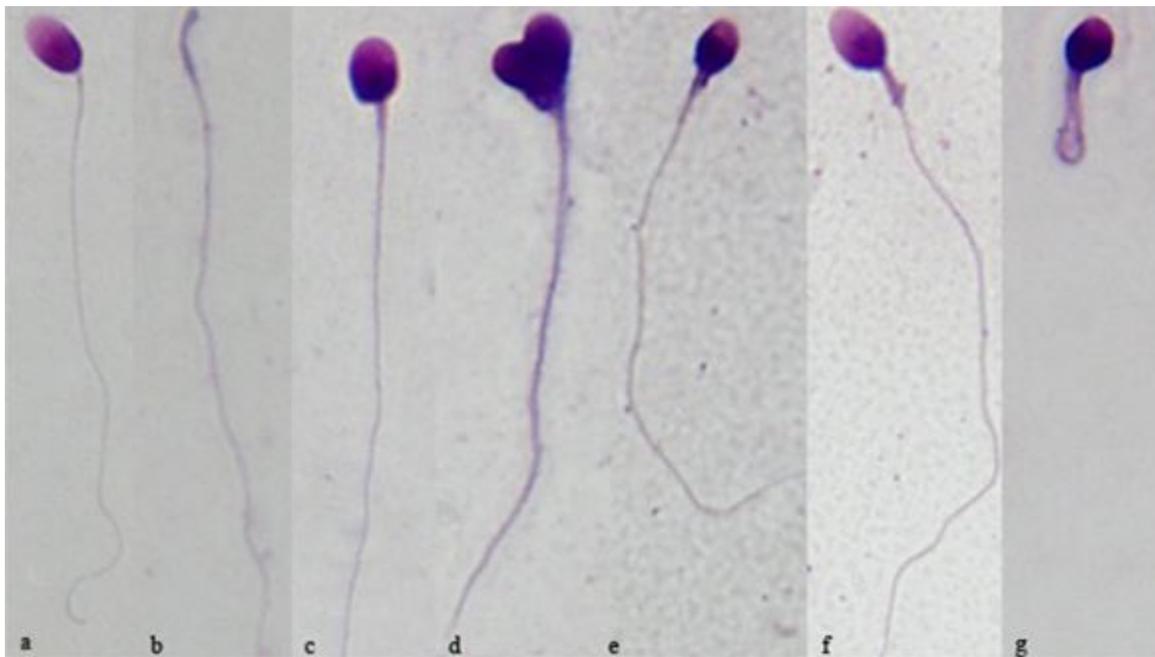


Figura 12. Morfología espermática, **a)** normal, **b)** sin cabeza, **c)** cabeza grande y amorfa, **d)** cabeza múltiple, **e)** cabeza pequeña y pieza media engrosada, **f)** pieza media engrosada, **g)** cola enrollada (fotomicrografía tomada a 1000x en el laboratorio de andrología IVI, México).

Aglutinación

Se consideró que hubo aglutinación cuando los espermatozoides móviles estuvieron unidos entre sí por la cabeza o cola o cabeza-cola. Se descartaron a los espermatozoides inmóviles o unidos a células o detritos, ya que se trataba de agregación. La búsqueda de aglutinación se realizó bajo el microscopio de contraste de fases con objetivo de 40x y se observaron al menos 10 campos.

3. Criopreservación del semen

Congelación

Se concentró la muestra seminal mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos; se eliminó el sobrenadante hasta dejar el botón celular diluido en un volumen de plasma seminal de 2 ml. Las muestras con volumen inicial de 2 ml no necesitaron de centrifugación.

A la muestra de semen se le añadió un ACP penetrante y no penetrante TYB (Irvine Scientific; California, EUA) de forma pausada para permitir el intercambio entre los espermatozoides y el medio de congelación y evitar un choque osmótico. Se utilizó igual volumen de crioprotector que de muestra. Después con pipeta Pasteur (esmerilada) se homogenizó la mezcla y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Posteriormente se homogenizó la mezcla y se depositó gota a gota sobre la superficie de una pastilla de hielo seco comprimido, sobre la cual se habían excavado pocillos de aproximadamente 5 mm de diámetro y 5 mm de profundidad para delimitar la gota.

Después de algunos segundos, se observó que estas gotas perdieron su brillo indicando su congelamiento, momento para ser depositadas dentro de un gobelet, previamente introducido en un recipiente con nitrógeno líquido. Posteriormente se almacenaron en el banco de semen por una hora.

Descongelación

Se transfirieron las píldoras a un tubo cónico de 15 ml (Falcon), el cual se sumergió en agua a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se realizó la valoración de la concentración y movilidad espermática.

4. Recuperación espermática

La recuperación espermática consiste en seleccionar aquellos espermatozoides con mejor movilidad mediante la eliminación del plasma seminal, espermatozoides inmóviles y muertos, junto con las células inmaduras y detritos. Son muchas las técnicas empleadas para tal efecto basadas en diversas hipótesis de conducta espermática; las que se utilizaron en este estudio fueron:

Desplazamiento de espermatozoides hacia la superficie.

Su principio se basa en que sólo los espermatozoides con buena movilidad podrán ascender a la superficie.

- Se colocó la muestra de semen con medio HTF (In Vitro Care; Frederick, MD, EUA) en relación 1:1 en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugo por 10 minutos a 2000 rpm, se decantó el sobrenadante.
- Al botón celular formado se le añadió 1 ml de medio HTF, el cual se hizo resbalar lentamente por las paredes del tubo y evitar la resuspensión del botón celular. (Figura 13).
- Se colocó el tubo dentro de la incubadora a 37°C con 45° de inclinación durante 30 minutos, tiempo necesario para la migración de los espermatozoides móviles a la superficie.
- Se recuperó 0.5 ml de la superficie del sobrenadante que contenían los espermatozoides móviles.



Figura 13. Desplazamiento de espermatozoides hacia la superficie.

Gradientes discontinuos de densidad

Su fundamento se basa en la selección de los espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presenta el sistema de gradientes de densidad a diferentes porcentajes y llegar al fondo del tubo, además de actuar como filtro para el plasma seminal, células redondas y aquellos espermatozoides con movilidad no progresiva.

- Se prepararon gradientes de 45, 75 y 90%. Para el gradiente de 45% se mezclaron 4.5 partes de solución PureSperm[®]100 (Nidacon; Goteborg, Suecia) con 5.5 partes de medio HTF.
- El gradiente de 75% se preparó mezclando 7.5 partes de solución PureSperm[®]100 con 2.5 partes de medio HTF.

- Finalmente para el gradiente de 90% se mezclaron 9 partes de solución PureSperm[®]100 con 1 parte de medio HTF.

La variación del volumen de cada uno de los gradientes, dependió de la cantidad de espermatozoides inmóviles y detritos en la muestra:

- La columna de gradientes de densidad se montó en un tubo cónico de 15 ml. Se colocó el gradiente de 90%, el cual se dejó resbalar suavemente por las paredes del tubo hasta el fondo de éste.
- Después se colocó el gradiente de 75%, el cual se dejó resbalar de igual manera que el anterior para evitar romper la tención superficial entre los gradientes y que estos se mezclarán. El gradiente de 45% se colocó de la manera antes mencionada.
- Por último se colocó la mezcla de semen y crioprotector sobre la parte superior de la columna (Figura 14).
- Se centrifugo la columna durante 10 minutos a 2000 rpm. Tiempo necesario para el desplazamiento de los mejores espermatozoides hacia el fondo del tubo, formando un botón celular.
- Se recuperó el botón celular del fondo del tubo y se resuspendió en 0.5 ml de medio HTF. Para el lavado se centrifugó durante 5 minutos a 800 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 ml de medio HTF.

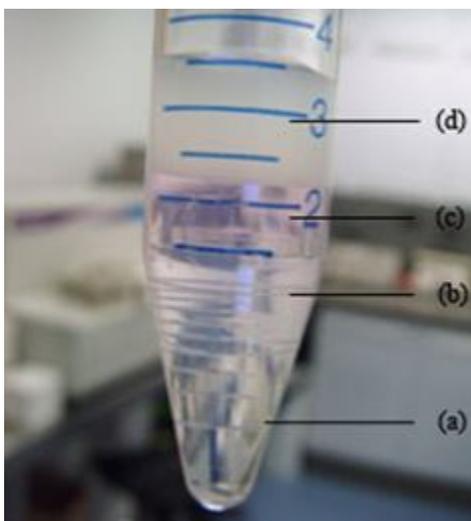


Figura 14. Columna de gradientes de densidad, **a)** 90%, **b)** 75%, **c)** 45%, **d)** muestra de semen.

5. Técnica de dispersión de la cromatina espermática

Para analizar la fragmentación del ADN de los espermatozoides de donante se utilizó el equipo Halosperm[®] (Halotech Dna; Madrid, España). El cual incluye portaobjetos pretratados con agarosa, tubos cónicos de 0.5 ml (eppendorf) con agarosa de bajo punto de fusión, solución desnaturalizante y solución de lisis.

Inclusión de la muestra en micrógel de agarosa

- Se diluyó la muestra de semen en medio HTF para obtener una concentración de 5 a 10 millones de espermatozoides por mililitro.
- Se colocó el tubo eppendorf con agarosa en un baño María a 90°C durante 5 minutos para fundir la agarosa. Después se transfirió el tubo eppendorf a otro baño María a 37°C y se dejó 5 minutos para equilibrar la temperatura.
- Se añadieron 60 µl de la muestra de semen diluida al eppendorf con agarosa y se mezclaron, inmediatamente después se colocaron 25 µl sobre el portaobjetos pretratado (previamente enfriado a 4°C) y se colocó un cubreobjetos.
- Se colocó el portaobjetos dentro del congelador durante 5 minutos, para que gelidificara la agarosa.

Procesado de la muestra

- Se tomó una alícuota de 80 µl de la solución desnaturalizante y se diluyeron con 10 ml de agua destilada, la disolución se colocó en una caja de incubación.
- Se sacó el portaobjetos del congelador y se retiró el cubreobjetos deslizándolo con suavidad y se introdujo en posición horizontal dentro de la disolución desnaturalizante, se dejó incubar por 7 minutos a temperatura ambiente.
- Con unas pinzas se retiró el portaobjetos, sujetándolo horizontalmente y de igual manera se depositó en una caja de incubación con 10 ml de solución de lisis por 25 minutos.
- De la manera antes mencionada se retiró el portaobjetos y se introdujo en una caja Petri con agua destilada para lavar el portaobjetos de la solución de lisis por 5 minutos.
- Se deshidrató la muestra de forma gradual, para lo cual se hizo pasar el portaobjetos por diferentes baños de alcohol al 70%, 90% y 100% (durante 2 minutos en cada uno) y se dejó secar al aire libre.

Tinción de la muestra

- Se mezcló solución de Wright (Merck; Dermstadt, Alemania) con solución de fosfatos pH 6.68 (Merck; Dermstadt, Alemania) en proporción 1:1 y se depositó en una caja Petri.

- Se colocó dentro el portaobjetos de manera que la solución cubrió toda la muestra y se dejó teñir por 10 minutos, posteriormente se lavó el portaobjetos con agua corriente y se dejó secar al aire libre.

Visualización al microscopio y clasificación

Los portaobjetos se observaron al microscopio de campo claro con objetivo de 100x y utilizando aceite de inmersión. Se cuantificaron 500 espermatozoides, clasificándolos de acuerdo a Fernández y col. (2003) en:

Espermatozoides sin ADN fragmentado

- Los espermatozoides con halo grande son aquellos en donde el halo es igual o mayor a la longitud del diámetro menor del núcleo (Figura 15a).
- Los espermatozoides con halo mediano presentan un halo mayor a 1/3 de la longitud del diámetro menor del núcleo y menor que éste (Figura 15b).

Espermatozoides con ADN fragmentado

- Espermatozoides con halo pequeño tienen un halo igual o menor a 1/3 del diámetro del núcleo, pudiendo ser de forma irregular o prácticamente inapreciable (Figura 15c).
- Los espermatozoides sin halo como su nombre lo indica no presentan halo (Figura 15d).
- Espermatozoides sin halo y degradados son aquellos que sin mostrar halo, presentan el núcleo fragmentado en gránulos o muestran una tinción muy débil (Figura 15e).

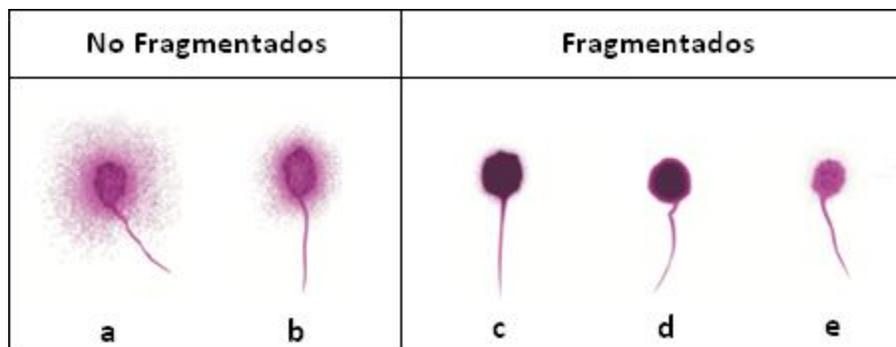


Figura 15. Espermatozoides con ADN no fragmentado y fragmentado, **a)** halo grande, **b)** halo mediano, **c)** halo pequeño, **d)** sin halo, **e)** degradado (tomado de Halosperm®).

6. Resultados de las técnicas de reproducción asistida de muestras de donante

Los resultados de las muestras de donantes de banco de semen utilizadas en técnicas de reproducción asistida se consultaron del archivo del IVI, México con permiso del director del laboratorio de andrología, Pedro Cuapio Padilla. A partir de este archivo se elaboró una base de datos con la que se trabajó.

7. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como media \pm desviación estándar. La comparación entre las medianas de la concentración, movilidad y DFI se analizó por la prueba de Wilcoxon, mientras que para la correlación entre el DFI y la movilidad se determinó el coeficiente de correlación de Spearman, de igual manera se determinó dicho coeficiente para la correlación entre los resultados de las técnicas de reproducción asistida de muestras de donante y el DFI. Para todas las pruebas las diferencias fueron consideradas significativas a $P < 0.05$. Estas pruebas fueron realizadas empleando el paquete estadístico SPSS (de sus siglas en inglés statistical package for the social sciences) versión 19.0.

VII. Resultados

1. Valoración de los parámetros seminales antes y después de la criopreservación de muestras de donante

Se analizaron 961 muestras seminales de 46 donantes de banco de semen (IVI, México), a cada una de las muestras se les evaluó los parámetros seminales macroscópicos y microscópicos en fresco.

Parámetros macroscópicos

En el momento en que las muestras de semen fueron recolectadas se midió el volumen y pH de éstas, cuyos valores promedios son 3.9 ± 1.6 ml y 7.6 ± 0.1 respectivamente.

Parámetros microscópicos

En el cuadro VI se muestra la media \pm D.E. de la concentración, vitalidad, movilidad de las diferentes clases de espermatozoides y la morfología que se obtuvo a partir del porcentaje de formas normales y anormales, de estos últimos se cuantificó la cantidad de defectos de cabeza, pieza media y cola.

Cuadro VI. Parámetros microscópicos de semen fresco de donante

Parámetros	Media \pm D. E.
Concentración (10^6 /ml)	133.8 ± 44.4
Vitalidad (%)	83.6 ± 5.5
Movilidad	
a (%)	0.03 ± 0.3
b (%)	60.2 ± 6.4
c (%)	13.3 ± 3.3
d (%)	26.4 ± 6.4
Morfología	
Normales (%)	7.6 ± 2.3
Anormales (%)	92.4 ± 2.3
Cabeza	89.6 ± 3.7
Pieza media	87.4 ± 5.6
Cola	21.5 ± 8.1

Desviación estándar (D.E.).

Posteriormente se congelaron las muestras y se almacenaron en el tanque de nitrógeno líquido (banco de semen), después se descongelaron y se analizó la concentración y movilidad de éstas, los valores obtenidos se muestran en el Cuadro VII.

Cuadro VII. Parámetros seminales de muestras descongeladas de donante

Parámetros	Media ± D.E.
Concentración (10 ⁶ /ml)	87.6 ± 29.7
Movilidad	
a (%)	0.0 ± 0.0
b (%)	45.3 ± 7.3
c (%)	13.9 ± 3.7
d (%)	40.8 ± 8.2

Desviación estándar (D.E.).

La comparación entre las medias de la concentración espermática de muestras en fresco y descongeladas de donante fue significativamente diferente, las muestras descongeladas mostraron menor concentración como se aprecia en el cuadro VIII.

Cuadro VIII. Comparación entre la concentración de muestras en fresco y descongeladas de donante

	Fresco (Media ± D.E.)	Descongelado (Media ± D.E.)
Concentración (10 ⁶ /ml)	133.8 ± 44.4	87.6 ± 29.7*

*P < 0.05; Desviación estándar (D.E.).

La comparación entre las medias de las diferentes clases de movilidad espermática de muestras en fresco y descongeladas de donante fueron significativamente diferentes, el número de espermatozoides con movilidad a y b disminuyó mientras que los espermatozoides con movilidad c y d aumentaron posteriormente a la descongelación como se muestra en el cuadro IX.

Cuadro IX. Comparación entre las diferentes clases de movilidad de muestras en fresco y descongeladas de donante

Movilidad	Fresco (Media ± D.E.)	Descongelado (Media ± D.E.)
a	0.03 ± 0.3	0.0 ± 0.0*
b	60.2 ± 6.4	45.3 ± 7.3*
c	13.3 ± 3.3	13.9 ± 3.7*
d	26.4 ± 6.4	40.8 ± 8.2*

*P < 0.05; Desviación estándar (D.E.).

2. Evaluación de la fragmentación del ADN espermático pre y postcriopreservación de muestras de donante

Se determinó el DFI espermático de muestras en fresco y descongeladas de cada uno de los donantes; la comparación entre las medias fue significativamente diferente como se muestra en el cuadro X.

Cuadro X. Comparación entre el DFI de muestras en fresco y descongeladas de donante

	Fresco (Media \pm D.E.)	Descongelado (Media \pm D.E.)
DFI (%)	5.6 \pm 2.3	10.5 \pm 4.9*

*P < 0.05; Desviación estándar (D.E.).

En la figura 16 se muestra una microfotografía de la fragmentación del ADN de espermatozoides de muestras en fresco y descongeladas de donante.

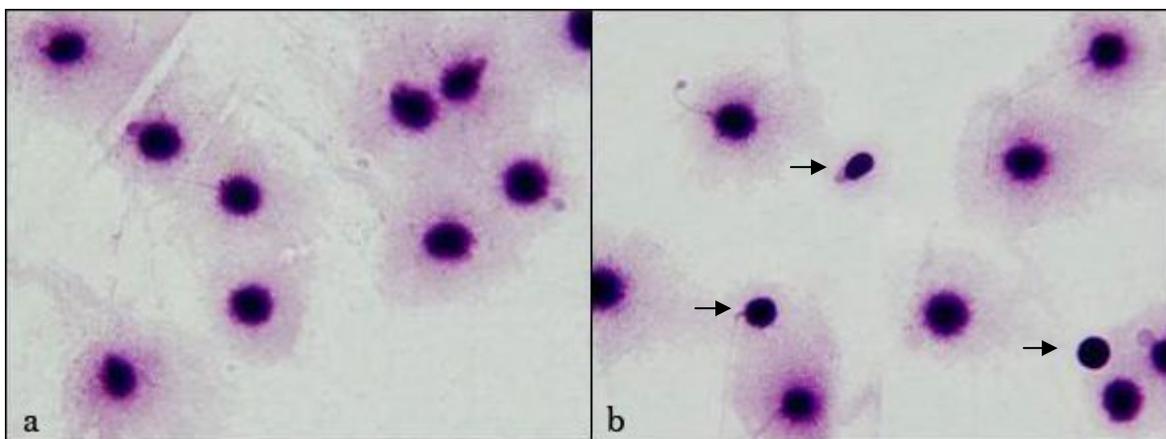


Figura 16. Fotomicrografía tomada a 1000x de espermatozoides procesados por la técnica de SCD y teñidos con tinción de Wright, (a) espermatozoides de muestras en fresco, (b) espermatozoides de muestras descongeladas, las flechas señalan a los espermatozoides con ADN fragmentado.

3. Establecimiento de la correlación entre la fragmentación del ADN y la movilidad espermática

Se observó una correlación positiva entre la movilidad del tipo d y el DFI en muestras descongeladas de donante como se muestra en el cuadro XI.

Cuadro XI. Correlación entre el índice de fragmentación del ADN y la movilidad espermática

Movilidad	Fresco		Descongelado	
	r	P-valor	r	P-valor
a	-	-	-	-
b	- 0.317	0.093	- 0.185	0.336
c	0.147	0.446	- 0.296	0.119
d	0.294	0.122	0.410	0.027

Coefficiente de correlación (r).

4. Determinación de la correlación entre la fragmentación del ADN y los resultados de muestras de donante empleadas en técnicas de reproducción asistida

De las 961 muestras de semen de donante se han utilizado 512 en TRA, las restantes o se encuentran en cuarentena para posteriormente corroborar la seronegatividad de anticuerpos VIH o todavía no han sido requeridas.

Las técnicas de reproducción asistida utilizadas fueron IAD, FIV e ICSI y la combinación de FIV/ICSI; en algunos procedimientos de alta complejidad se emplearon óvulos de donante (OD).

En el cuadro XII se describe el número de muestras seminales empleadas en cada una de las TRA, los embriones congelados y **no transferidos** sólo para los procedimientos de alta complejidad (FIV, ICSI), las **betas negativas** y **positivas** de estas últimas se encuentran algunas en espera de resultados, abortos y **embarazos bioquímicos**.

Cuadro XII. Resultados de las técnicas de reproducción asistida de muestras de donante

Técnicas de reproducción asistida	No.	EC	ENT	β -	β +	ER	Abortos (%)	Embarazos Bioquímicos (%)
IAD	237	-	-	132	105	9	12 (11.4)	4 (3.8)
FIV	23	0	4	11	8	0	0	1 (12.5)
ICSI	36	2	8	17	9	1	1 (11.1)	1 (11.1)
FIV/ICSI	67	0	12	27	28	1	8 (28.5)	2 (7.14)
OD/ICSI	86	9	15	23	39	1	12 (30.7)	7 (17.9)
OD/FIV/ICSI	63	0	6	23	34	1	10 (29.4)	3 (8.8)
Total	512	11	45	233	223	13	43 (19.2)	18 (8)

Inseminación artificial (IAD), fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplásmica del espermatozoide (ICSI), óvulos de donante (OD), número de muestras (No.), embriones congelados (EC), embriones no transferidos (ENT), betas negativas (β -), betas positivas (β +), betas positivas en espera de resultados (ER).

En el cuadro XIII se describe el número de betas positivas que finalizaron con recién nacidos en las diferentes TRA, los nacimientos con único producto y con gemelos bivitelinos y el total de recién nacidos.

Cuadro XIII. Recién nacidos obtenidos de muestras de donante empleadas en técnicas de reproducción asistida

Técnicas de reproducción asistida	β + de embarazos con RN	NUP (%)	NGB (%)	RNT
IAD	80	66 (82.5)	14 (17.5)	94
FIV	7	4 (57.1)	3 (42.9)	10
ICSI	6	3 (50)	3 (50)	9
FIV/ICSI	17	13 (76.4)	4 (23.6)	21
OD/ICSI	19	15 (78.9)	4 (21.1)	23
OD/FIV/ICSI	20	10 (50)	10 (50)	30
Total	149	111(74.5)	38 (25.5)	187

Inseminación artificial (IAD), fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplásmica del espermatozoide (ICSI), óvulos de donante (OD), betas positivas (β +), recién nacidos (RN), nacimientos con único producto (NUP), nacimientos con gemelos bivitelinos (NGB), recién nacidos totales (RNT).

Se observó una correlación negativa entre el DFI y los nacimientos con gemelos bivitelinos, en IAD e ICSI como se muestra en el cuadro XIV. En el caso de FIV, FIV/ICSI, OD/ICSI y OD/FIV/ICSI no se encontró ninguna correlación significativa entre los resultados de estas técnicas y el DFI, por lo cual no se muestran dichos datos.

Cuadro XIV. Correlación entre el índice de fragmentación del ADN espermático y los resultados de muestras de donante empleadas en técnicas de reproducción asistida

	IAD		ICSI	
	r	P-valor	r	P-valor
NT	-	-	-0.343	0.178
β +	- 0.303	0.054	-0.147	0.573
β -	0.303	0.054	0.227	0.380
Abortos	- 0.291	0.065	-	-
EB	- 0.002	0.992	-	-
NUP	-0.210	0.192	0.120	0.645
NGB	- 0.480	0.002	-0.504	0.039
RNT	- 0.157	0.327	-0.158	0.544

Embriones no transferidos (NT), betas positivas (β +), betas negativas (β -), embarazos bioquímicos (EB), nacimientos con único producto (NUP), nacimientos con gemelos bivitelinos (NGB), recién nacidos totales (RNT), coeficiente de correlación (r).

VIII. Discusión

El presente estudio muestra que el proceso de congelación y descongelación al que se someten las muestras de semen de donante durante la técnica de criopreservación, incrementa la fragmentación del ADN de los espermatozoides.

El porcentaje de espermatozoides que presentan morfología normal y anormal, observados en este estudio concuerdan con los que reporta Ozkavukcu y col. (2008). Sin embargo, difieren de los mostrados por otros estudios en donde el porcentaje de espermatozoides con morfología normal es mayor (Irvine y col, 2000; Velez de la Calle y col, 2008; Varghese y col, 2009; Cruz y col, 2010; Hu y col, 2011; Brahem y col, 2011). Esta diferencia se atribuye a los criterios empleados para la evaluación de la morfología espermática, entre los que se encuentran el criterio de David y Kruger (Padrón y col, 1998). Este último se utilizó en el presente estudio.

Debido a que a todas las muestras seminales a congelar se les adicionó un crioprotector en proporción 1:1 para obtener un volumen final de 4 ml, aquellas muestras con volumen menor al mencionado presentaron una variación de la concentración de espermatozoides, por este aspecto metodológico en el presente estudio se observó la disminución de la concentración espermática posterior a la descongelación. Yogev y col (2010) dividieron muestras seminales de donante en dos alícuotas, una de 0.5 ml y otra de 0.2 ml para ser criopreservadas, al descongelar ambas alícuotas observaron que la concentración de espermatozoides fue menor en la alícuota de 0.2 ml.

Diferentes estudios han mostrado que la movilidad de los espermatozoides disminuye posterior a la criopreservación (Donnelly y col, 2001; de Paula y col, 2006; Ozkavukcu y col, 2008; Zribi y col, 2010). El protocolo de criopreservación en estos estudios fue el congelamiento de muestras seminales de pacientes y donantes por exposición a vapores de nitrógeno líquido seguida de la inmersión en éste, la descongelación fue a temperatura ambiente seguida de la incubación a 37°C; observaron que el número de espermatozoides con movilidad progresiva de las muestras descongeladas fue significativamente menor que en las muestras en fresco. Estos resultados coinciden con los del presente trabajo, donde se observó la disminución en el número de espermatozoides con movilidad progresiva (a y b) y el aumentó en el número de espermatozoides no progresivos e inmóviles (c y d), que indican el evidente deterioro de la movilidad posterior a la criopreservación.

Se ha descrito que el potencial de la membrana mitocondrial está estrechamente relacionado con la movilidad espermática debido a que el gradiente electroquímico establecido por el potencial de membrana es necesario para la producción de ATP por parte de la cadena transportadora de electrones (O'Connell y col, 2002). Por lo tanto, el deterioro de la movilidad espermática se puede deber al daño generado en la membrana mitocondrial por los cambios de temperatura, estrés osmótico y formación de hielo intracelular durante el proceso de criopreservación (Fernández y col, 2009). Se ha observado en los espermatozoides la disminución progresiva de la movilidad cuando son congelados y descongelados más de una vez (Thomson y col, 2010) a diferencia de cuando sólo se realiza un procedimiento de criopreservación que mantiene casi inalterable la movilidad por largos periodos de tiempo (Yogev y col, 2010).

Actualmente se ha tomado en cuenta la valoración del material genético del espermatozoide y su implicación en la infertilidad, por lo cual es necesaria su evaluación. En las últimas décadas se ha mostrado que el proceso de criopreservación aumenta la fragmentación del ADN de los espermatozoides (Donnelly y col, 2001; Gandini y col, 2006; Thomson y col, 2009; Zribi y col, 2010). Sin embargo, hay autores que muestran que el proceso de criopreservación no daña la integridad del ADN espermático (Duru y col, 2001; Paasch y col, 2004). En el presente estudio se observó el incremento del doble de espermatozoides con ADN fragmentado posterior a la criopreservación.

Se ha observado que muestras de semen con parámetros alterados presentan mayor fragmentación del ADN espermático que muestras con parámetros normales (Huang y col, 2005). Se ha descrito en pacientes que las muestras seminales de éstos son más susceptibles a presentar fragmentación del ADN espermático que muestras de donantes (Ahmad y col, 2010) y entre estos últimos se han observado diferencias en la capacidad para mantener la integridad del ADN después de la congelación y descongelación (Gosálvez y col, 2009). Por lo tanto, una de las posibles razones de que algunos autores y este trabajo mostraron el aumento de la fragmentación del ADN posterior a la criopreservación y otros no, se debe a la variabilidad de características espermáticas que se tienen de una población a otra y entre los individuos de una misma población e incluso entre las muestras seminales de un mismo individuo.

Los mecanismos por los cuales se genera daño al material genético del espermatozoide durante la criopreservación no han sido del todo elucidados, entre los descritos por diferentes publicaciones se muestra la generación de ERO en la congelación y descongelación (Alvarez y Storey, 1992; Chatterjee y Gagnon, 2001;). Las ERO modifican la estructura química de las bases nitrogenadas (p.ej. la guanina se convierte en 8-hidroxiguanina) en la molécula del ADN, volviéndola más inestable y vulnerable a la fragmentación (Bennetts y Aitken, 2005; Badouard y col, 2008; Cemeli y Anderson, 2011). Por lo tanto, la fragmentación del ADN espermático puede deberse en parte al estrés oxidante generado por las ERO durante la criopreservación (Zribi y col, 2010). Se ha observado que durante las primeras horas posteriores al descongelamiento se tiene la mayor velocidad de degradación del ADN espermático (Gosálvez y col, 2009).

Otros autores han observado la activación de caspasas (3, 8 y 9) (Paasch y col, 2004) y la externalización de la fosfatidilserina (Duru y col, 2001) posterior a la criopreservación, los cuales son indicadores del proceso apoptótico, sin embargo, no observaron un mayor impacto sobre la fragmentación del ADN espermático.

Thomson y col. (2009) mostraron que la fragmentación del ADN espermático se debe en gran medida al estrés oxidante más que al proceso de apoptosis durante la criopreservación. Observaron una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN y el porcentaje de células positivas al marcador de estrés oxidante (8-hidroxiguanina) e identificaron una correlación negativa entre el porcentaje de células positivas al marcador de caspasas (fluorocromo inhibidor de caspasas) y el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN.

Koppers y col (2011) indujeron apoptosis en espermatozoides humanos por medio de la inhibición de la fosfoinositol-3-quinasa y mostraron que la fragmentación del ADN no se produce directamente por la apoptosis como se describe en las células somáticas, sin embargo, puede ser precipitado secundariamente por daño oxidante al ADN. Esto posiblemente se deba a la arquitectura física de los espermatozoides que impide la traslación física de las nucleasas provenientes de las mitocondrias y el citoplasma, al núcleo.

En este estudio el hecho que se observe la correlación positiva entre el número de espermatozoides clase d y el DFI es un indicador de la presencia de ADN fragmentado en los espermatozoides inmóviles, lo cual se puede explicar por la generación de estrés oxidante durante el proceso de criopreservación debido a la presencia de ERO que rompen los enlaces asociados a los ácidos grasos insaturados de la membrana plasmática y mitocondrial e inducen daño oxidante al ADN nuclear y mitocondrial (Bennetts y Aitken, 2005; Badouard y col, 2008), estos daños interfieren con la función normal de las mitocondrias por lo tanto la motilidad del flagelo decae.

Koppers y col (2008, 2011) caracterizaron el proceso de apoptosis en los espermatozoides humanos y observaron la activación de caspasas, externalización de la fosfatidilserina, formación de vacuolas citoplasmáticas, daño oxidante al ADN, generación de ERO por las mitocondrias y disminución de la movilidad como un mecanismo inmediato para evitar la participación de espermatozoides defectuosos en la fecundación.

Diferentes autores han mostrado que existe relación entre la integridad del ADN y la movilidad espermática en muestras de pacientes y donantes (Huang y col, 2005; Benchaib y col, 2007; Velez de la Calle y col, 2008; Lin y col, 2008; Tavalae y col, 2009; Moskovtsev y col, 2009; Cruz y col, 2010), además de otros parámetros seminales como la concentración, vitalidad, morfología y volumen. Sin embargo, otros autores han observado que no existe relación entre el DFI y la movilidad espermática de muestras provenientes de pacientes (Moskovtsev y col, 2009; Mehdi y col, 2009; Brahem y col, 2011) o de donantes (Varghese y col, 2009). Las diferencias de los resultados entre la movilidad y la integridad del material genético de los espermatozoides en los diversos estudios realizados puede explicarse por el tamaño y tipo de poblaciones empleadas en cada uno de ellos, así como también a la sensibilidad de las técnicas empleadas para evaluar la fragmentación del ADN (Irvine y col, 2000).

La evaluación de los parámetros seminales (concentración, vitalidad, movilidad, morfología, entre otros) proporciona una idea general del potencial reproductivo del varón (Vásquez y Vásquez, 2007) pero por sí mismos son pobremente predictivos de los resultados de las TRA, por lo cual ha tomado particular interés evaluar la integridad del ADN espermático y su relación con los resultados de los procedimientos de reproducción asistida.

En el presente estudio se observó una correlación negativa entre el DFI y los nacimientos de gemelos bivitelinos en IAD e ICSI, indicando que cuando se obtienen dos ovocitos viables para ser fecundados por IAD o se transfieren dos óvulos fecundados por ICSI al útero materno, existe la probabilidad de que ambos embriones lleguen a término del

embarazo cuando el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN es bajo. Sin embargo, también existen factores maternos involucrados en la implantación de ambos embriones y el adecuado desarrollo de éstos que les permiten llegar al término del embarazo, entre estos factores se encuentran el índice de masa corporal y el consumo de ácido fólico, además la estación del año se ha visto involucrada (Hoekstra y col, 2008).

En la literatura no se ha mostrado la relación entre el DFI y los nacimientos de gemelos bivitelinos en TRA. Se ha mostrado en IAD e IAH que la tasa de embarazos y recién nacidos es mayor cuando el DFI no excede el 30% (Bungum y col, 2007; Hu y col, 2011; Thomson y col, 2011)

En este estudio no se observó correlación entre el DFI y los embriones no transferidos, número de embarazos (betas positivas), embarazos bioquímicos, abortos, nacimientos con único producto y recién nacidos totales. Estudios en pacientes han mostrado que no existe relación entre el DFI y los resultados de las TRA (Huang y col, 2005; Benchaib y col, 2007; Bungum y col, 2007; Velez de la Calle y col, 2008; Lin y col, 2008). Sin embargo otros autores han mostrado en pacientes que sí existe relación entre el DFI y el número de embarazos en FIV e ICSI (Bakos y col, 2007) y la tasa de abortos en IAD, FIV e ICSI (Benchaib y col, 2007; Kennedy y col, 2010),

La discrepancia entre los resultados mostrados por otros autores y los observados en este estudio pueden deberse en parte al tipo de población empleada, si el análisis realizado se llevó a cabo en espermatozoides seleccionados por algún método de separación (desplazamiento de espermatozoides hacia la superficie o gradientes de densidad), la técnica empleada para evaluar el daño al ADN espermático y el número de embriones transferidos así como también el número de recién nacidos vivos por procedimiento realizado (Bakos y col, 2007).

El presente estudio mostró que el proceso de congelación y descongelación de la técnica de criopreservación aumentó la fragmentación del ADN y disminuyó la movilidad espermática, además ambas variables se encuentran correlacionadas positivamente. También mostró que cuando se obtienen dos ovocitos para ser fecundados por IAD o se transfieren dos óvulos fecundados por ICSI al útero materno, existe una correlación negativa entre la fragmentación del ADN y la obtención de gemelos bivitelinos.

La criopreservación es una técnica útil para mantener la capacidad fecundante de los espermatozoides por largos periodos de tiempo, sin embargo, es necesario mejorar los protocolos de congelación y descongelación ya que es durante estas etapas donde los espermatozoides son expuestos a cambios bruscos de temperatura y experimentan estrés oxidante que comprometen su integridad genética y viabilidad. Por otra parte evaluar la integridad genética de los espermatozoides es una herramienta más de diagnóstico que permite optar por uno u otro procedimiento de reproducción asistida y obtener resultados favorables, por lo tanto es necesario analizar la fragmentación del ADN desde el punto de vista dinámico, porque conforme pasa el tiempo la fragmentación va aumentando y la velocidad con la que se degrada puede diferir de una persona a otra. Estudiar la dinámica de fragmentación del ADN y su relación con los parámetros seminales y TRA sería una opción para profundizar en este tema.

IX. Conclusiones

El proceso de criopreservación aumentó la fragmentación del ADN y disminuyó la movilidad espermática de muestras de donante. La criopreservación no compromete la capacidad fecundante de los espermatozoides, por lo tanto pueden ser utilizados en técnicas de reproducción asistida y lograr resultados satisfactorios.

La fragmentación del ADN espermático y la pérdida de movilidad de los espermatozoides se encuentran relacionadas posterior a la criopreservación.

La integridad del ADN de los espermatozoides favoreció obtener gemelos bivitelinos cuando se generaron dos óvulos viables para ser fecundados por IAD o se transfirieron dos óvulos fecundados por ICSI al útero materno.

No se encontró alguna otra correlación entre la fragmentación del ADN y los embriones no transferidos, betas positivas y negativas, embarazos bioquímicos, abortos y recién nacidos totales.

X. Glosario

Astenozoospermia: es la baja movilidad de los espermatozoides del semen, menos del 50% de movilidad tipo a + b o menos de 25% del tipo a.

Congénita: es cualquier rasgo o entidad presente en el nacimiento, adquirido durante la vida intrauterina. Puede ser resultado de un factor genético, físico, químico o infeccioso.

Beta positiva: es la presencia de la gonadotropina coriónica humana (hCG) en sangre u orina la cual es producida por la placenta de las mujeres embarazadas.

Beta negativa: significa que no hay embarazo por lo tanto no hay hCG en sangre u orina.

Citrato de clomifeno: es un fármaco derivado del trifeniletileno de la familia de los estilbenos, diseñado para inducir la ovulación en los tratamientos de fertilidad.

Cumulus oophorus: grupo de células del folículo ovárico que rodean al ovocito en el estado de folículo preovulatorio.

Dineína: es la proteína motora más importante de los microtúbulos de los flagelos y cilios.

Embarazo bioquímico: embarazo diagnosticado sólo por la detección de hCG en suero u orina y que no se desarrolla embarazo clínico.

Embriones no transferidos: son embriones que debido a su mala calidad no se transfieren al útero materno posterior a la fecundación de ovocitos por técnicas de reproducción asistida.

Gemelos bivitelinos: son los que se originan por la fecundación separa y más o menos simultánea de dos ovocitos por dos espermatozoides.

Hipospermia: es una alteración del semen del varón en la que el volumen del eyaculado es inferior a 2 mililitros.

Isotónico: hacen referencia aquellos sistemas con una membrana semipermeable en donde la concentración de solutos es igual tanto internamente como externamente.

Metacromáticas: se refiere a la propiedad que tienen algunos colorantes para producir tonos de color totalmente distintos al que se espera por el colorante empleado.

Nucleoides: se refiere al núcleo sin proteínas.

Oligozoospermia: es la baja concentración de espermatozoides, menos de 20 millones de espermatozoides por mililitro de semen.

Plexo pampiniforme: red de venas del cordón espermático que drena los testículos en la vena espermática, en el abdomen inferior.

Polispermia: entrada de más de un espermatozoide en el ovocito al fertilizar.

Protaminas: son proteínas básicas, solubles en agua que aparecen asociadas al ADN en los espermatozoides de los mamíferos.

Punto crioscópico: es la disminución de la temperatura del punto de congelación que experimenta una disolución respecto a la del disolvente puro.

Punto eutéctico: temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido.

Solvatación: es el proceso de asociación de moléculas de un disolvente con moléculas o iones de un soluto. Al disociarse iones o partículas con carga en un solvente polar, éstos se dispersan y son rodeados por las moléculas del solvente.

SPO11: es una topoisomerasa de tipo II.

Telómeros: hace referencia a los extremos de los cromosomas, las cuales son regiones de ADN no codificante, altamente repetitivas, cuya función es la estabilidad estructural de los cromosomas en las células eucariontes.

Tubulina: se denomina a un heterodímero formado por dos subunidades (α y β) que al ensamblarse de manera altamente organizada genera uno de los principales componentes de los microtúbulos

Xenobióticos: se trata de compuestos de naturaleza química muy variada, algunos de los cuales son de origen natural, si bien la inmensa mayoría son productos originados por la propia actividad humana, como los contaminantes ambientales o los compuestos químicos de síntesis.

XI. Bibliografía

- ◆ Agarwal A., Said T. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility, *Human Reproduction*, 9(4): 331-345.
- ◆ Agarwal A., Allamaneni S. (2005). Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina, *Revista Internacional de Andrología*, 3(1): 31-37.
- ◆ Ahmad L., Jalali S., Shami S., Akram Z., Batool S., Kalsoom O. (2010). Effects of cryopreservation on sperm DNA integrity in normospermic and four categories of infertile males, *Systems Biology in Reproductive Medicine* 56(1): 74-83.
- ◆ Aitken R., Krausz C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome, *Reproduction*, 122(4): 497-506.
- ◆ Aitken R., Kooppers A. (2011). Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa, *Asian Journal of Andrology*, 13(1): 36-42.
- ◆ Alvarez J., Storey B. (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation, *Journal of Andrology*, 13(3):232-241.
- ◆ Angelopoulou R., Plastira K., Msaouel P. (2007). Spermatozoa sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmentation DNA, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5(36).
- ◆ Arrondo J., Pomerol J. (1994). Recuerdo anatomofisiológico del testículo y vía seminal. En su: *Práctica andrológica*, Ed. Científicas y técnicas, Masson-Salvat Medicina, España, pág. 3-13.
- ◆ ASRM practice committee (2006) (a). Report on optimal evaluation of the infertile male, *Fertility and Sterility* (86)4: S202-S209.
- ◆ ASRM practice committee (2006) (b). Optimal evaluation of the infertile female, *Fertility and Sterility* (86)4: S264-S267.
- ◆ Ávila-Portillo L., Madero J., López C., León M., Acosta L., Gómez C., Delgado L., Gómez C., Lozano J., Reguero M. (2006). Fundamentos de criopreservación, *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4): 295-300.

- ◆ Badouard C., Ménézou Y., Panteix G., Ravanat J., Douki T., Cadet J., Favier A. (2008). Determination of new types of DNA lesions in human sperm, *Zygote*, 16(1): 9-13.

- ◆ Bakos H., Thompson J., Feil D., Lane M. (2007). Sperm DNA damage is associated with assisted reproductive technology pregnancy, *International Journal of Andrology*, 31: 518-526.

- ◆ Ballescá J. (1999). Valoración clínica de la función testicular, En: Vanrrelv J., Calaf J., Balasch J., Viscasillas P., *Fertilidad y esterilidad humanas: Tomo I Esterilidad e infertilidad*, Ed. Masson, España, pág. 23-35.

- ◆ Barth A., Oko R. (1989). *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. 5th ed. Ames: Iowa State University Press, EUA, pág. 285.

- ◆ Benchaib M., Braun V., Lornage J., Hadj S., Salle B., Lejeune H., Guérin J. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique, *Human Reproduction*, 18(5): 1023-1028.

- ◆ Benchaib M., Lornage J., Mazoyer C., Lejeune H., Salle B., Guerin J. (2007). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome, *Fertility and Sterility*, 87(1): 93-100.

- ◆ Bloomfield V., Crothers D., Tinoco I. (2000). *Nucleic acids: structures, properties and fuctions*, University Science Books, Sausalito California, EUA, pág. 794.

- ◆ Bennetts E., Aitken R. (2005). A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa, *Molecular Reproduction and Development*, 71(1): 77-87.

- ◆ Bonilla-Musoles F., Dolz M., Casañ E., Moreno J., Raga F., Caballero O., Castillo J., Bonilla F., Abad de Velasco L. (2009). Inseminación artificial, En: *Reproducción asistida: abordaje en la práctica clínica*, Ed. Médica Panamericana, España, pág. 297-303.

- ◆ Borini A., Tarozzi N., Bizarro D., Bonu M., Fava L., Flamigni C., Coticchio G. (2006). Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART, *Human Reproduction*, 21(11): 2876-2881.

- ◆ Brahem S., Mehdi M., Landolsi H., Mougou S., Elghezal H., Saad A. (2011). Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss, *Urology*, 78(4): 792-796.
- ◆ Brugo-Olmedo S., Chillik C., Kopelman S. (2003). Definición y causa de la infertilidad, *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 54(4): 227-248.
- ◆ Bungum M., Huimaidan P., Axmon A., Spano M., Bungum L., Erenpreiss J., Giwercman A. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome, *Human Reproduction*, 22(1): 174-179.
- ◆ Campos I., Magán R., Ruzafa C., Muriel L. (2008). Congelación de semen en píldoras, En: Remohí J., Cobo A., Romero J., De los santos M.J., Pellicer A., *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana; laboratorio de reproducción asistida*, Mc Graw Hill Interamericana, España, pág.31-37.
- ◆ Cemeli E., Anderson D. (2011). Mechanistic investigation of ROS-induced DNA damage by oestrogenic compounds in lymphocytes and sperm using the comet assay, *Internal Journal of Molecular Sciences*, 12(5): 2783-2796.
- ◆ Chatterjee S., Gagnon C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing, *Molecular Reproduction and Development*, 59(4): 451-458.
- ◆ Chohan K., Griffin J., Lafromboise M., De Jonge C., Carrell D. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm, *Journal of Andrology*, 27(1): 53-59.
- ◆ Clark G., Liu Y., Baker H. (2006). Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucid after more than 28 years of storage in liquid nitrogen, *Fertility and Sterility*, 86(3): 721-722.
- ◆ Cocuzza M., Sikka S., Athayde K., Agarwal A. (2007). Clinical relevance of oxidative and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis, *International Brazilian Journal of Urology*, 33(5): 603-621.
- ◆ Cortés-Gutiérrez E., Dávila-Rodríguez M., López-Fernández C., Fernández J., Gosálvez J. (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático, *Actas Urológicas Españolas*, 31(2): 120-131.

- ◆ Cruz I., Colmenares M., Berrueta-Carrillo L., Gomez-Perez R., Montes H., Berrueta L., Salmen S., Osuna J. (2010). Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen, *Investigación Clínica*, 51(1): 87-99.

- ◆ de Paula T., Pimenta R., Montagnini D., Adelaide M., Schor N., Pereira A. (2006). Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia, *Fertility and Sterility*, 86(3): 597-600.

- ◆ Denison F., Grant V., Calder A., Kelly R. (1999). Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release, *Molecular Human Reproduction*, 5(3): 220-226.

- ◆ Donnelly E., McClure N., Lewis S. (2001). Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity, *Fertility and Sterility*, 76(5): 892-900.

- ◆ Dorado M., Migueles B., González M., Hebles M., Aguilera L., Sánchez P., Sánchez F., Rodríguez A., Lara J., Meyer M., Cruz N. (2008). Relación entre los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático, *Revista Internacional de Andrología*, 6(1): 14-17.

- ◆ Drobnis E., Crowe L., Berger T., Anchordoguy T., Overstreet J., Crowe J. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model, *Journal of Experimental Zoology*, 256(4): 432-437.

- ◆ Duran E., Morshedi M., Taylor S., Oehninger S. (2002). Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study, *Human Reproduction*, 17(12): 3122-3128.

- ◆ Duru N., Morshedi M., Schuffner A., Oehninger S. (2001). Cryopreservation-thawing of fragmentation human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation, *Journal of Andrology*, 22(4): 646-651.

- ◆ Erenpreiss J., Hlevicka S., Zalkalns J., Erenpreisa J. (2002). Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples, *Journal of Andrology*, 23(5): 717-723.

- ◆ Erenpreiss J., Spano M., Bungum M., Giwercman A. (2006). Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects, *Asian Journal of Andrology*, 8(1): 11-29.
- ◆ 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, *Journal of Andrology*, 23(1): 25-43.
- ◆ Farrel K. (1982) Purification and reassembly of tubulin from outer doublet microtubules. En: Wilson L., *Methods in cell biology*, vol. 24, Ed. Academic Press, EUA, pág. 61-78.
- ◆ Fernández J., Muriel L., Rivero M., Goyanes V., Vazquez R., Alvarez J. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation, *Journal of Andrology*, 24(1): 59-66.
- ◆ Fernández A., Gonzalvo M., Clavero A., Ruiz R., Zamora S., Roldán M., Rabelo B., Ramírez J., Yoldi A., Castilla J. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen, *Revista Asebir*, 14(1): 17-25.
- ◆ Feldschuh J., Brassel J., Durso N., Levine A. (2005). Successful sperm storage for 28 years, *Fertility and Sterility*, 84(4): 1017.
- ◆ Fuentes-Mascorro G., Serrano H., Rosado A. (2000). Sperm Chromatin, *Archives of Andrology*, 45(3): 215-225.
- ◆ Fuller B., Paynter S. (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine, *Reproductive BioMedicine Online*, 9(6): 680-691.
- ◆ Galán A., Campos P., Blanco C., Salinas R., Cobo A. (2008). Inseminación de ovocitos En: Remohí J., Cobo A., Romero J., De Los Santos M., Pellicer A., *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana; laboratorio de reproducción asistida*, Mc Graw Hill Interamericana, España, pág. 151-156.
- ◆ Gandini L., Lombardo F., Lenzi A., Spano M., Dondero F. (2006). Cryopreservation and sperm DNA integrity, *Cell and Tissue Banking*, 7(2):91-98.
- ◆ Garrido N., Meseguer M. (2008). Bancos de semen, En: Remohí J., Cobo A., Romero J., De los santos M., Pellicer A., *Manual práctico de esterilidad y*

reproducción humana; laboratorio de reproducción asistida, Mc Graw Hill Interamericana, España, pág.47-51.

- ◆ Gerton G. (2002). Function of the sperm acrosome. En: Hardy D., Fertilization, Ed. Academic Press, EUA, pág. 265-302.
- ◆ Gijón L. (2009). Donación de espermatozoides y banco de semen, En: Bonilla-Musoles F., Dolz M., Moreno J., Raga F., Reproducción asistida: abordaje en la práctica clínica, Ed. Medica Panamericana, España, pág. 321-328.
- ◆ Góngora A. (2003). Los bancos de esperma. una alternativa antes al infertilidad de origen masculino., Revista del Hospital Juárez de México, 70(4): 157-160.
- ◆ Góngora A., Campilla G., Trejo P. (2003). Criopreservación espermática, impacto sobre la tasa de sobrevivencia y su repercusión al futuro, Acta Médica Grupo Ángeles, 1(3): 133-137.
- ◆ Góngora A. (2006). La donación espermática como alternativa ante el factor masculino severamente alterado, Revista de la Facultad de Medicina (UNAM), 49(3).
- ◆ Góngora A., Fontanilla D. (2010). La fragmentación de ADN espermático, influencia sobre las técnicas de reproducción asistida y la calidad embrionaria, Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, 61(2): 160-164.
- ◆ Góngora-Rodríguez A. (2005). La calidad espermática es determinante en la tasa de embarazo obtenida en procedimientos de inseminación intrauterina, Revista de Sanidad Militar Mexicana, 59(3): 160-164.
- ◆ Gosálvez J., Fernández J., Goyanes V., López-Fernández C. (2007). Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD), Farnespaña Industrial, Marzo/Abril: 2-9.
- ◆ Gosálvez J., Cortés-Gutierrez E., López-Fernández C., Fernández J., Caballero P., Núñez R. (2009). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors, Fertility and Sterility, 92(1): 170-173.
- ◆ Guyton A., Hall J. (2001). Tratado de Fisiología Medica, Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, México, pág. 1280.

- ◆ Halosperm[®] es una marca comercial de HalotechDna, SL, Parque Científico de Madrid /PTM-c/ Santiago Grisolia 2/ 28760 Tres Cantos (Madrid)/ T+34 91 571 35 98/F+34 91 567 15 57/www.halotech.es/info@halotech.es
- ◆ Hoekstra C., Zhen Z., Lambalk C., Willemsen G., Martin N., Boomsma D., Montgomery G. (2008). Dizygotic twinning, *Human Reproduction*, 14(1): 37-47.
- ◆ Horne G., Atkinson A., Pease E., Logue P., Brison R., Lieberman. (2004). Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment: case report, *Human Reproduction*, 19(6): 1448-1449.
- ◆ Hu J., Zhu w., Liu W., Fan L. (2011). Factors affecting fecundity among sperm donors: a multivariate analysis, *First International Journal of Andrology*, 43(3): 155-162.
- ◆ Huang C., Lin D., Tsao H., Cheng T., Liu C., Lee M. (2005). Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates, *Fertility and Sterility*, 84(1): 130-140.
- ◆ Huidobro C. (2010). Infertilidad masculina, *Revista Médica Clínica las Condes*, 21(3): 368-375.
- ◆ Irvine D., Twigg J., Gordon E., Fulton N., Milne P., Aitken J. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality, *Journal of Andrology*, 21(1): 33-44.
- ◆ Jausoro A. (2000). Reproducción humana asistida: Descripción de las opciones terapéuticas disponibles, Gobierno Vasco, Informe n°Osteba E-00-05.
- ◆ Jones R. (1997). *Human reproduction biology*, Ed. Academic Press, EUA, pág. 291.
- ◆ Kempisty B., Depa-Martynow M., Lianeri M., Jedrzejczak P., Darul-Wasowicz A., Jagodzinski P. (2007). Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45(1): 109-113.
- ◆ Kennedy C., Ahlering P., Rodriguez H., Levy S., Sutovsky P. (2010). Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction, *Reproductive Biomedicine Online*, 22(3): 272-276.

- ◆ Klug W., Cummings M., Spencer C., Palladino M. (2012). Concepts of genetics, 10th edición, Pearson Education, pág. 742.
- ◆ Koppers A., De Iulii G., Finnie J., McLaughlin E., Aitken R. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(8): 3199-3207.
- ◆ Koppers A., Mitchell L., Wang P., Lin M., Aitken R. (2011). Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa, *Biochemical Journal*, 436(3): 687-698.
- ◆ Krawetz S. (2005). Paternal contribution: new insights and future challenges, *Nature Reviews Genetics*, 6(8): 633-642.
- ◆ Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. Disponible en: enlace externo <http://www.boe.es/boe/dias/2006/05/27/pdfs/A19947-19956.pdf>. Consultado el 24/06/2011.
- ◆ Lin M., Lee R., Li S., Lu C., Sun F., Hwu Y. (2008). Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates, *Fertility and Sterility*, 90(2): 352-359.
- ◆ Marcon L., Boissonneault G. (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling, *Biology of Reproduction*, 70(4): 910-918.
- ◆ Marieb E. (2001). Human anatomy and physiology, 6th ed., Ed. Pearson Benjamin Cummings, pág. 1249.
- ◆ Matorras R., Hernández J., Molero D. (2008). Reproducción humana para enfermería, Editorial Medica Panamericana, España, pág. 605.
- ◆ Mehdi M., Khantouche L., Ajina M., Saad A. (2009). Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa correlation with semen parameters, *First International Journal of Andrology*, 41(6): 383-386.

- ◆ Miller D., Brinkworth M., Lles D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics, *Society for Reproduction and Fertility*, 139(2): 287-301.
- ◆ Monesi V. (1982). Espermatogénesis y espermatozoides, En: Austin C., Short R., Células germinales y fertilización, Ed. Científicas La Prensa Médica Mexicana, México, pág. 49-87.
- ◆ Morales R., Lledó B., Ortiz J., Rodríguez-Arnedo D., Fabregat A., Bernabeu R. (2007). Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad, *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 24(5): 305-313.
- ◆ Moskovtsev S., Willis J., White J., Mullen B. (2009). Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities, *Urology*, 74(4): 789-793.
- ◆ Narváez H. (2004). Actualización en la valoración y manejo de la infertilidad masculina, *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 55(1): 60-70.
- ◆ O'Connell M., McClure N., Lewis S. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function, *Human Reproduction*, 17(3): 704-709.
- ◆ Oliva R. (2006). Protamines and male infertility, *Human Reproduction*, 12(4): 417-435.
- ◆ Olivera M., Ruiz T., Tarazona A., Giraldo C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4): 426-436.
- ◆ Ozkavukcu S., Erdemli E., Isik A., Oztuna D., Karahuseyinoglu S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(8): 403-411.
- ◆ Paasch U., Sharma R., Gupta A., Grunewald S., Mascha E., Thomas A., Glander H., Agarwal A. (2004). Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa, *Biology of Reproduction*, 71(6): 1828-1837.
- ◆ Pádrón R., Fernández G., Gallardo M. (1998). Interpretación del análisis seminal, *Revista Cubana de Endocrinología*, 9(1): 81-90.

- ◆ Pardo M. (1994). Criopreservación de espermatozoides humanos. Bancos de semen, En: Pomeroy J., Arrondo J., Práctica andrológica, Ed. Científicas y Técnicas, Masson-Salvat Medicina, Barcelona España, pág. 381-185.
- ◆ Pérez E. (2007). Atención integral de la infertilidad: endocrinología, cirugía y reproducción asistida, Ed. McGraw-Hill Interamericana, México, pág. 809.
- ◆ Poongothai J., Gopenath T., Manonayaki S. (2009). Genetics of human male infertility, Singapore Medical Journal, 50(4): 336-347.
- ◆ Quintero W., Mallea L., Machado A., Loópez N., Céspedes E., Monzón G., Yepes S. (2000). Efecto del estrés oxidativo sobre la calidad del semen de pacientes infértiles con leucocitospermia, Revista Cubana de Investigación Biomédica, 19(3): 183-185.
- ◆ Remohí J., Bellver J., Domingo J., Bosch E., Pellicer A. (2008). Manual práctico de esterilidad y reproducción humana; aspectos clínicos, Ed. Mc Graw Hill Interamericana, España, pág. 534.
- ◆ Rosas M. (2007). Infertilidad masculina: causas, diagnóstico y tratamiento, OFFARM farmacia y sociedad, 26(7): 70-75.
- ◆ Ruiz F. (1988). Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción, UNAM, México, pág. 374.
- ◆ Said T., Gaglani A., Agarwal A. (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury, Reproductive BioMedicine Online, 21(4): 456-462.
- ◆ Sergerie M., Laforest G., Bujan L., Bissonnette F., Bleau G. (2005). Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility, Human Reproduction, 20(12): 3446-3451.
- ◆ Shamsi M., Kumar R., Dada R. (2008). Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction, Indian Journal of Medical Research, 127(2): 115-123.
- ◆ Silverthorn D. (2008). Fisiología humana: un enfoque integrado, Ed. Médica Panamericana, Argentina, pág. 860.

- ◆ Smith R., Kaune H., Parodi D., Madariaga M., Ríos R., Morales I., Castro A. (2006). Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress, *Human Reproduction*, 21(4): 986-993.
- ◆ Spano M., Bonde J., Hióllund H., Kolstad H., Cordelli E., Leter G. (2000) Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish first pregnancy planner study team, *Fertility and Sterility*, 73(1): 43-50.
- ◆ Stornelli M., Tittarelli C., Savignone C., Stornelli M. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal, *Analecta Veterinaria*, 25(2): 28-35.
- ◆ Tähhä K. (1986). Current aspects of Leydig cell function and its regulation, *Journals of Reproduction and Fertility*, 78(2): 367-380.
- ◆ Tavalae M., Razavi S., Nasr-Esfahani M. (2009). Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome, *Fertility and Sterility*, 91(4): 1119-1126.
- ◆ Thomson L., Fleming S., Aitken R., De luliis G., Zieschang J., Clarck A. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis, *Human Reproduction*, 24(9): 2061-2070.
- ◆ Thomson L., Fleming S., Barones K., Zieschang J., Clark A. (2010). The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation, *Fertility and Sterility*, 93(4): 1147-1156.
- ◆ Thomson L., Zieschang J., Clark A. (2011). Oxidative deoxyribonucleic acid damage in sperm has a negative impact on clinical pregnancy rate in intrauterine insemination but not intracytoplasmic sperm injection cycles, *Fertility and Sterility*, 96(4): 843-847.
- ◆ Torregrosa N., Domínguez-Fandos D., Camejo M., Shirley C., Meistrich M., Balleca J., Oliva Rafael. (2006). Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients, *Human Reproduction*, 21(8): 2084-2089.
- ◆ Tortolero I., Arata-Bellabarba G., Osuna J., Gómez R., Regadera J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática, *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 3(3): 12-19.

- ◆ Twigg J., Fulton N., Gomez E., Irvine D., Aitken R. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants, *Human Reproduction*, 13(6): 1429-1436.
- ◆ Varghese A., Bragais F., Mukhopadhyay D., Pal M., Bhattacharyya A., Agarwal A. (2009). Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics, *First International Journal of Andrology*, 41(4): 207-215.
- ◆ Vásquez F., Vásquez D. (2007). Espermograma y su utilidad clínica, *Salud Uninorte*, 23(2): 220-230.
- ◆ Veeck L. (1999). An atlas of human gametes and conceptuses, Phartenon Publishing Group, España, pág. 127.
- ◆ Velázquez G. (2009). Fisiología de la reproducción humana, *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*, 1(4): 115-130.
- ◆ Velez de la Calle J., Muller A., Walschaerts M., Clavere J., Jimenez C., Wittemer C., Thonneau P. (2008). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study, *Fertility and Sterility*, 90(5): 1792-1799.
- ◆ Walker W., Cheng J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells, *Reproduction*, 130(1): 15-28.
- ◆ Ward W., Coffey D. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells, *Biology of Reproduction*, 44(4): 569-574.
- ◆ Ward W. (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa, *Biology of Reproduction*, 48(6): 1193-1201.
- ◆ Watson F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4): 871-891.

- ◆ Wykes S., Krawetz S. (2003). The structural organization of sperm chromatin, *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32): 29471- 29477.
- ◆ World Health Organization. (1999). WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th Ed. Cambridge University Press, Reino Unido, pág. 128.
- ◆ World Health Organization. (2010). WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5thEd.Suiza, pág. 271.
- ◆ Yogev L., Kleiman S., Shabtai E., Botchan A., Paz G., Hauser R., Lehavi O., Yavetz H., Gamzu R. (2010). Long-term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration, *Human Reproduction* 25(5): 1097-1103.
- ◆ Yoshinaga K., Toshimori K. (2003). Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microscopy Research Technique*, 61(1): 39-45.
- ◆ Zaneveld L., De Jonge C., Anderson R., Mack S. (1991). Human sperm capacitation and the acrosome reaction, *Human Reproduction*, 6(9): 1265-1274.
- ◆ Zini A., Meriano J., Kader K., Jarvi K., Laskin C., Cadesky K. (2005). Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI, *Human Reproduction*, 20(12): 3476-3480.
- ◆ Zini A., Libman J. (2006). Sperm DNA damage: clinical significance in the era assisted reproduction, *Canadian Medical Association Journal*, 175(5): 495-500.
- ◆ Zribi N., Chakroun N., Euch H., Gargouri J., Bahloul A., Keskes L. (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity, *Fertility and Sterility*, 93(1): 159-166.
- ◆ Zulategui J., Cobo A., Romero J., Galán A., Albert C., De los santos M. (2008). Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI), En: Remohí J., Cobo A., Romero J., De los santos M., Pellicer A. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana; laboratorio de reproducción asistida*, Ed. Mc Graw Hill Interamericana, España, pág. 165-176.