



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
"ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES"**

SUBDIRECCIÓN DE MEDICINA REPRODUCTIVA

**IDENTIFICACIÓN DE INDICADORES APOPTÓTICOS EN
FRACCIONES ESPERMÁTICAS DE ALTA Y BAJA
MOVILIDAD QUE SON SOMETIDOS A
CRIOPRESERVACIÓN EN PACIENTES INFÉRTILES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALIALISTA EN BIOLOGÍA
DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

PRESENTA

DR. EVARISTO MARTÍNEZ BARRIOS

**DR. GREGORIO PÉREZ PALACIOS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN
EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

**DR. JUAN GERARDO BARROSO VILLA
DIRECTOR DE TESIS**



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Autorización de Tesis

Identificación de indicadores apoptóticos en fracciones espermáticas de alta y baja movilidad que son sometidos a criopreservación en pacientes infértiles.

Dr. Enrique Gómez Sánchez
Director de Enseñanza.

Dr. Gregorio Pérez Palacios
Profesor Titular del Curso de Especialización.

Dr. Juan Gerardo Barroso Villa
Director de Tesis.

“A mi esposa Angélica y a mi hijo Emilio con todo mi amor”

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme existencia para culminar esta etapa.

A mis padres y mis hermanos, porque a ustedes debo absolutamente todo lo que soy.

A mis “abuelitas” Caro y Paty por ser mis hermanas durante todo este tiempo.

A mis compañeros y amigos: Christian, Francisco, Pedro, Edgar, Gaby, Juan, Martín, Fernando, Elizabeth, Gerardo, Israel, mucho aprendí de ustedes y con ustedes.

A todos mis maestros, gracias por compartir sus conocimientos.

Al Dr. Carlos Valdespín y las biólogas Nardhy Gómez y Xóchitl Flores parte medular de este proyecto.

Un especial agradecimiento al Dr. Juan Gerardo Barroso Villa, tutor de este trabajo de tesis, gracias por su tiempo y paciencia.

INDICE DE CONTENIDOS

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Planteamiento del Problema	12
Justificación	13
Objetivos	14
Hipótesis	14
Diseño del Estudio	15
Criterios de Selección	15
Material y Métodos	17
Resultados	25
Discusión	34
Conclusiones	38
Bibliografía	39

RESUMEN

Objetivo: Analizar el efecto de la criopreservación en la inducción de apoptosis en poblaciones espermáticas de alta y baja movilidad en pacientes infértiles.

Material y Métodos: Se realizó un estudio piloto en donde se evaluaron los espermatozoides de pacientes fértiles (grupo control) e infértiles (grupo de estudio) que aceptaron participar en el estudio. Por ser un estudio piloto, se incluyeron 5 pacientes en el grupo de estudio y 3 pacientes en el grupo control. Las muestras obtenidas de los pacientes (fértiles e infértiles) mediante masturbación, tras 3-5 días de abstinencia sexual fueron capacitadas para separar dos subpoblaciones de espermatozoides con alta y baja movilidad. Las dos subpoblaciones obtenidas de cada grupo (4 en total) fueron analizadas independientemente para determinarles su concentración, movilidad y morfología, además de analizarse con Anexina-V y anticuerpos anticaspasa-3 (como marcadores apoptóticos tempranos), con el método de TUNEL (como marcador apoptótico tardío) y con yoduro de propidio (como marcador de células necróticas) mediante citometría de flujo. Posteriormente, se criopreservaron las muestras por 72hrs y se descongelaron. Finalmente, fueron nuevamente valoradas en parámetros de concentración, movilidad, morfología y marcadores de apoptosis. Para la detección de marcadores apoptóticos, los espermatozoides marcados fueron analizados con el citómetro de flujo FC500.

Resultados: Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el índice de positividad para Anexina V en la fracción de alta movilidad del grupo control antes y después de la criopreservación de las muestras (23.3 ± 2.3 vs 30.4 ± 0.53). De igual forma, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el índice de positividad para Caspasa-3a en la fracción de alta movilidad del grupo de estudio antes y después de la criopreservación de las muestras (0.32 ± 0.40 vs 0.56 ± 0.19). Se observó una discreta diferencia significativa ($p = 0.06$) en el índice de positividad para TUNEL en la fracción de alta movilidad del grupo de estudio antes y después de la criopreservación de las muestras (1.86 ± 1.67 vs 1.94 ± 1.02).

Conclusión: La técnica de criopreservación de gametos favorece un aumento en la expresión de marcadores apoptóticos tempranos (anexina V y Caspasa 3) y tardíos (TUNEL) en fracciones espermáticas de alta movilidad.

ABSTRACT

Objective: To analyze the effect of cryopreservation and thawing over the induction of apoptotic markers in sperm cells of high and low motility of men with infertility.

Materials and Methods: A pilot study was designed to evaluate the effect of cryopreservation and thawing over sperm cells of high and low motility of fertile and infertile men. Only 8 patients were included in this study, 5 in the study group (infertile patients) and 3 in the control group (fertile patients). Sperm samples of all patients were collected by masturbation after 3 to 5 days of ejaculation abstinence and they were prepared to separate each sample in high and low motility fractions. Each semen fraction of both groups were analyzed for sperm concentration, motility and morphology parameters, and also for early (Anexin-V and activated caspase-3) and late apoptotic markers by flow cytometry. Cryopreservation (for 72 hours) and thawing of all samples was then done. Finally, after thawing all samples, the same parameters were analyzed, in order to evaluate the effect of this process over all the studied parameters.

Results: Cryopreservation and/or thawing induced significant changes in all apoptotic markers. Significant differences ($p < 0.05$) were demonstrated in the incidence of anexin V in high motility sperm fractions of fertile men before and after cryopreservation (23.3 ± 2.3 vs 30.4 ± 0.53). Significant differences were also found ($p < 0.05$) in the incidence of activated caspase 3 in high motility sperm fractions of infertile men before and after cryopreservaton (0.32 ± 0.40 vs 0.56 ± 0.19). Finally, a small but significant difference ($p = 0.06$) was demonstrated in the incidence of positive TUNEL sperm cells in high motility fractions of infertile men before and after cryopreservation (1.86 ± 1.67 vs 1.94 ± 1.02).

Conclusion: Cryopreservation acts as an early (anexin V and caspase 3) and late (TUNEL) apoptotic marker inducer in high motility sperm fractions of infertile patients.

INTRODUCCIÓN

La necrosis y la muerte celular programada ó apoptosis son las formas habituales de muerte celular en el organismo humano. Las características morfológicas de ambas, permiten en la mayoría de los tejidos, establecer claras diferencias.

La necrosis es una serie de eventos que involucran numerosas células vecinas cubriendo una extensión variable con desintegración. Durante este evento, se lleva a cabo la destrucción de la membrana celular, permitiendo el escape de elementos tóxicos al espacio extracelular, lo que desencadena un proceso inflamatorio con efectos nocivos alrededor del área necrótica. Al ser un proceso desorganizado, el material cromatínico sufre una dispersión irregular, diferenciándolo en gran medida de la apoptosis. Las causas de necrosis son múltiples (agentes tóxicos, traumáticos e hipóxicos) y en su mayoría, patológicas⁽¹⁾.

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico, interactivo y organizado que afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas. A diferencia de la necrosis, la membrana celular no se destruye, lo que impide el escape de su contenido al espacio extracelular, resultando en un proceso "silencioso", sin inflamación. En el citoplasma, se produce una granulación fina con conservación de algunos organelos (en especial las mitocondrias) que tienen un rol interactivo importante. A nivel nuclear, la cromatina se condensa y se agrupa formando diversos cuerpos apoptóticos. A su vez, la membrana celular se recoge sobre las eminencias globuliformes que forman los elementos deteriorados del citoplasma y núcleo. Finalmente, fagocitos captan la célula en su totalidad impidiendo la inflamación de las células vecinas. Se ha demostrado en tejidos epiteliales que si parte del material apoptótico escapa a la acción de los fagocitos, es captado por células vecinas que envían señales moleculares a la célula apoptótica como mecanismo complementario.

Resumiendo, podemos mencionar que la apoptosis es una muerte celular programada que se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan en la eliminación de las células sin la presencia de una respuesta inflamatoria^(1,2).

Al igual que en diferentes eventos tanto fisiológicos como patológicos los procesos reproductivos no son ajenos a estas vías de activación, los cuales repercutirán en la capacidad reproductiva tanto en el hombre como en la mujer. Normalmente, existe un equilibrio entre la reproducción celular y la apoptosis a fin de mantener la población adecuada al momento en que los tejidos han llegado al estado adulto de desarrollo. La división autosómica es permanente con excepción de algunos grupos celulares como las neuronas y los cardiomiocitos⁽¹⁾.

Durante el desarrollo embriológico, la reproducción celular es mayor que la apoptosis. Sin embargo, en ciertos momentos, la segunda predomina cuando deben desaparecer tejidos como las membranas interdigitales, branquias, elementos cloacales, etc. cuya persistencia forman alteraciones congénitas. Fisiológicamente, la apoptosis juega un rol importante en las atresias, como sucede en la atresia folicular del ovario. La división somática produce en forma constante miles de millones de células nuevas y para mantener la homeostasis tisular debe desaparecer alrededor de la mitad de ellas. Así, mitosis y apoptosis mantienen el equilibrio celular en los tejidos. Se ha señalado en forma muy acertada, que la muerte del organismo humano es una tragedia; pero la muerte permanente de la mitad de sus células es esencial para su existencia⁽¹⁾.

Existen mecanismos pro o anti-apoptóticos, regulados genéticamente, que actúan en forma activa (pues consumen energía) y equilibrada⁽³⁾. Inicialmente, los biólogos e investigadores sospechaban que la apoptosis era una función necesaria para evitar la sobreproducción celular. Sin embargo, actualmente sabemos que es un proceso ordenado que no produce reacción tisular y por ello es difícil de identificar. En 1972, Kerr y col.⁽²⁾, comenzaron a estudiar organelos en

células neoplásicas, detectando que muchas células desaparecían en los cultivos. Esto llevó al estudio de imágenes cinemáticas que mostraron, mediante microscopía electrónica, las alteraciones que sufre la célula en un proceso que es de corta duración, demorando menos de una hora.

La apoptosis puede estar suprimida, en equilibrio o incrementada. Por ejemplo, se encuentra suprimida durante el desarrollo de espermatogonias, en las criptas de las glándulas intestinales (que es un epitelio de crecimiento rápido) y durante la lactancia, en donde el tejido mamario aumenta su masa celular. Por otra parte, está en equilibrio respecto a la mitosis en los tejidos adultos sanos como se ha observado en epitelios de tejidos normales (hígado, mama, corteza suprarrenal y tubo digestivo). Es muy significativo su rol homeostático en la médula ósea, donde debe destruir en forma permanente, la mitad de una inmensa cantidad de células (alrededor de 5×10^{11} leucocitos cada 24 hrs). Finalmente, la apoptosis se encuentra incrementada cuando existen tejidos que contienen células envejecidas, mutadas, neoplásicas, alteradas por tóxicos y las que están en proceso de metamorfosis o atresia. Se ha estudiado esta condición en neutrófilos envejecidos, en megacariocitos con citoplasma agotado por producción excesiva de plaquetas, en la atresia folicular del ovario, en folículos pilosos en evolución y en la mama durante la involución post-lactancia^(1,3).

Durante el ciclo celular, se determina cuándo es que la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción, o continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce así, un balance entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido⁽⁴⁾.

La vía de "receptores transmembrana" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la "proteína compleja Fas" y el factor de necrosis tumoral TNF⁽⁴⁾.

La proteína transmembrana Fas (en su porción intracelular), se une con un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain), activando las caspasas 8 y 10. En cambio, si la parte interna de la molécula se asocia a otro factor llamado DaXX, se activan proteinoquinasas que conducen al efecto contrario; es decir, estimulan el ciclo celular y la mitosis. Esta proteína (Fas), permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado Fas ligando, proteína que actúa como detonador de la vía, en donde solo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparada para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores^(3,4).

Algo similar sucede con el otro "receptor de membrana" TNF. Su porción intracelular conecta con complejos intermedios como el Tradd (TNF receptor associated death domain) y Raidd (receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado Traf (TNF receptor associated factor) activan proteinoquinasas y estimulan la proliferación celular; es decir, el efecto contrario^(3,4).

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales uno de los más importantes y mejor estudiados es el complejo de cisteino-aspártico proteasas denominadas "caspasas". Se han descrito 10 caspasas en células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos. Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La cadena de degradación proteica tiene sucesivos clivajes dependientes de la ubicación del ácido aspártico que se repite en la estructura de la enzima. Se han descrito hasta 40 substratos en la catálisis, proceso que en células cultivadas demora entre 30 y 40 minutos. La activación de las caspasas, proteínas que existen en calidad de procaspasas inactivas (cimógenos), se produce por diversas vías en que participan varios complejos moleculares⁽⁴⁾.

En los últimos años, se ha mostrado un interés particular por descubrir la participación de la apoptosis durante la espermatogénesis, y se ha observado que es un mecanismo importante en su desarrollo^(5,6). Además, se ha demostrado que las alteraciones en los procesos apoptóticos se asocian con infertilidad masculina, al observar una elevada frecuencia de apoptosis en células germinales de tejido testicular en pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa^(7,8).

En la actualidad, es bien conocido que la apoptosis de las células germinales es un mecanismo subyacente en la espermatogénesis normal, por lo que se ha demostrado en biopsia de testículos humanos un cierto grado de apoptosis espontánea⁽⁸⁾. Sin embargo, la apoptosis en los espermatozoides eyaculados ha sido poco estudiada, y desde de la publicación de Gorczyca y col⁽⁹⁾, cuando se describió por primera vez una relación entre espermatozoides anormales y la fragmentación del DNA, se han propuesto distintos métodos para detectar el fenómeno apoptótico en espermatozoides maduros y por lo tanto, su participación en la calidad del semen eyaculado⁽¹⁰⁾. Por otra parte, se ha observado que existe una relación significativa entre la presencia de apoptosis en espermatozoides maduros y la calidad del semen⁽¹¹⁾, por lo que se ha sugerido que la identificación de marcadores apoptóticos, puede ser un factor importante para la evaluación de la calidad seminal.

Existen diferentes técnicas para evaluar la presencia de apoptosis en el espermatozoide. Al parecer, pueden clasificarse en aquellas que detectan el proceso apoptótico en etapas tempranas y aquellas que lo detectan en etapas tardías. Dentro de los métodos de detección temprana de apoptosis, se encuentra la identificación de la fosfatidilserina (FS) en la capa externa de la membrana celular mediante la adición de anexina V, la anexina V es una proteína que muestra afinidad por fosfolípidos dependiente de calcio, con alta afinidad por la FS, así, ésta proteína nos indica el comienzo del proceso apoptótico^(12,Error! No se encuentra el origen de la referencia.). La unión de anexina V a células apoptóticas puede detectarse por una tinción verde fluorescente con isotiocianato de fluoresceína

(FITC) que puede medirse mediante citometría de flujo y microscopia fluorescente. Acoplado a esta técnica, se adiciona el yoduro de propidio (IP) para una tinción roja que diferencia las células necróticas de las viables con o sin translocación de fosfatidilserina.

Otra forma de detectar el proceso de apoptosis en etapas tempranas es mediante la detección de proteasas de cisteína aspartato específicas también llamadas caspasas⁽¹⁴⁾. Se ha observado, que las caspasas participan como transductores y efectores tempranos en las diferentes vías apoptóticas en células somáticas⁽¹⁵⁾, por lo que su detección mediante anticuerpos monoclonales nos indica el comienzo del proceso de muerte celular programada en forma muy inicial. Las caspasas juegan un rol crucial en la transducción de señales intracelulares en las células que son destinadas a la muerte programada.⁽¹⁶⁾ La activación de las caspasas ocurre por proteólisis y/o el resultado de la acción de otras proteínas⁽¹⁷⁾. La unión de Fas- ligando en la membrana celular y un incremento de Bax/Bcl2 en la membrana mitocondrial dan inicio a la activación de las caspasas 8 y 9 respectivamente⁽¹⁸⁾. Una vez activadas estas caspasas la señal se transduce a las caspasas efectoras, incluyendo las caspasas 3, 6 y 7⁽¹⁸⁾. Éstas enzimas causan degradación de los sustratos celulares, incluyendo las proteínas estructurales citoplasmáticas como actina y citoqueratinas y/o proteínas nucleares como poli (ADP ribosa) polimerasas (PARP) y laminasas⁽¹⁹⁻²²⁾. Al parecer, la caspasa 3 produce la activación de una dexosirribonucleasa (CAD, también llamada Factor-40 de fragmentación de DNA o nucleasa activada por caspasa), la cual, se encuentra involucrada en la fragmentación del DNA⁽²³⁻²⁵⁾. Por lo anterior, la determinación de la caspasa 3, mediante anticuerpos monoclonales específicos permite detectar la activación de la apoptosis.

Uno de los eventos tardíos y más representativos de la cascada apoptótica es la activación de endonucleasas endógenas que generan fragmentación en el ADN y por lo tanto, una multitud de grupos hidroxilo 3'. Esta propiedad es utilizada por el método ya conocido de TUNEL para identificar células apoptóticas al marcar

las terminales 3´hidroxilo con nucleótidos de desoxiuridina trifosfato con algún compuesto como fluoresceína (FITC-dUTP)⁽²⁶⁾. La enzima terminal dexosinucleotidil transferasa (TdT) cataliza la adición independiente de (FITC-dUTP) a las terminales 3´ hidroxilo del ADN, por lo que en células apoptóticas un número sustancial de estos sitios se encuentran disponibles para su identificación mediante el método de TUNEL.

Diferentes factores han sido asociados con la estimulación de la cascada apoptótica en espermatozoides maduros. Entre los factores relacionados se encuentran la irradiación, el tabaquismo⁽²⁷⁾, la hipertermia testicular^(28,29), la quimioterapia y radioterapia^(30,31), la inflamación del tracto genital⁽³²⁾ y la criopreservación-descongelamiento⁽³³⁾ de la muestra seminal.

La criopreservación da lugar a varias modificaciones estructurales y funcionales a nivel celular por lo que en general se acepta que la funcionabilidad del espermatozoide descongelado tras criopreservación está reducida al compararlo con semen fresco. Una de las más importantes es la alteración en la integridad de la membrana⁽³⁴⁻³⁶⁾. Sin embargo, el mecanismo por el cual se daña la membrana por la criopreservación y descongelación no se conoce por completo en el esperma humano.

El efecto deletéreo que con mayor frecuencia se observa con la criopreservación del semen humano es una marcada disminución en la movilidad del flagelo. La primera causa de daño celular durante la criopreservación es la formación de hielo intracelular. De cualquier forma, la supervivencia celular depende de la naturaleza del medio en que se suspende, y el conocimiento actual del medio de criopreservación ha permitido el desarrollo de numerosos agentes protectores⁽³⁷⁾.

Crioprotectores como el glicerol o el propanediol pueden agregarse a las células para disminuir el daño por congelación, al disminuir la concentración de

sales e incrementar la fracción de agua no congelada, reduciendo el estrés osmótico. El estrés osmótico, atribuible a diferencias en la permeabilidad relativa de los crioprotectores parece ser un factor importante en el daño por frío. El glicerol y la yema de huevo son los crioprotectores más frecuentemente utilizados para mantener la integridad de la membrana celular durante la congelación y descongelación. El porcentaje de sobrevida espermática incrementa al aumentar la concentración de glicerol con un porcentaje de congelación constante⁽³⁸⁾.

Donnelly y col.⁽³⁹⁾, reportaron que la criopreservación espermática resulta en una disminución del 45% de la velocidad de los espermatozoides en movimiento. Un decremento mayor se observó en la movilidad de los espermatozoides de hombres infértiles en comparación a donadores fértiles. Aún cuando estimulantes artificiales como pentoxifilina y 2-deoxiadenosina pueden mejorar significativamente la movilidad del espermatozoide descongelado, hay un decremento sustancial en la calidad del espermatozoide después de la criopreservación. Además, aún cuando la criopreservación se asocia a disminución en la viabilidad y movilidad espermática, la criopreservación en hombres con una pobre calidad seminal no afecta el porcentaje de fertilización y embarazo después de ICSI (inyección intracitoplasmática del espermatozoide), siempre y cuando se inyecte un espermatozoide viable. Sin embargo, en la inseminación intrauterina (IUI) el semen fresco tiene tres veces mayor posibilidad de producir un embarazo que el congelado.

También Donnelly y col.⁽³⁹⁾, identificaron una disminución significativa del 20% en la integridad del ADN de espermatozoides criopreservados. El ADN de espermatozoides en hombres fértiles se ha encontrado normal después de la criopreservación, mientras que el espermatozoide de hombres infértiles adquirió un daño significativo durante la criopreservación/descongelación. De igual forma, se ha encontrado un efecto deletéreo en la morfología del espermatozoide tanto en hombres fértiles como infértiles.

La criopreservación y descongelación resulta en daño de la membrana plasmática y el acrosoma como se ha demostrado por microscopia electrónica⁽⁴⁰⁾. Las alteraciones en la viabilidad, movilidad, velocidad y potencial de fertilización se deben parcialmente a cambios en la integridad de la membrana. A pesar que el mecanismo por el cual se daña la membrana por la congelación y descongelación no se conoce completamente, la evidencia ha mostrado que el estrés de la membrana plasmática durante la congelación y descongelación de los espermatozoides maduros puede condicionar una transición en los lípidos de la membrana del espermatozoide, lo que la hace propensa a fracturas tempranas, contribuyendo más que la lipoperoxidación al daño subletal en el esperma humano⁽⁴¹⁻⁴³⁾. Un daño mayor puede deberse a la peroxidación de ácidos grasos insaturados por radicales libres en la membrana celular. Se ha documentado disminución de la actividad de la enzima superóxido dismutasa debido a la pérdida de la enzima de su anclaje en la membrana. De igual forma, la congelación se ha asociado con disminución en el contenido de los fosfolípidos de la membrana con pérdida principalmente de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

Se ha demostrado que el número de espermatozoides positivos para anexina-V aumenta significativamente después de someter a los espermatozoides maduros a la criopreservación, concluyendo que la concentración y la movilidad espermática disminuyen con el uso de la criopreservación y por tanto genera una disminución en la calidad espermática⁽⁴⁴⁾.

La criopreservación es parte fundamental de las técnicas de reproducción asistida por lo que creemos importante evaluar si genera cambios en el espermatozoide maduro que activen la cascada apoptótica y por tanto repercutan en el resultado de las técnicas de reproducción.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La criopreservación y el factor masculino son importantes áreas de la reproducción en donde la investigación continúa renovando los conocimientos actuales. La criopreservación es una herramienta fundamental en las técnicas de reproducción por lo que su impacto sobre las células germinales y los blastocistos es de completa relevancia. Se han reportado diversos estudios relacionados con los cambios que genera la criopreservación sobre los espermatozoides. Alguno de los cambios reportados es el aparente aumento de la apoptosis que se produce después de la congelación/descongelación de la muestra seminal. Sin embargo, muchos de los estudios descritos hasta el momento, no han sido en humanos. Además, no se han determinado de manera simultánea, diferentes marcadores apoptóticos en una misma muestra y por citometría de flujo. Demostrar el aumento de la muerte celular programada en células espermáticas de pacientes infértiles tras criopreservación es fundamental para tratar de prevenirla y por tanto mejorar la tasa de embarazo tras la criopreservación de células germinales. Consideramos necesario realizar un estudio completo sobre el efecto de la criopreservación sobre los espermatozoides humanos en relación a la apoptosis que pudiera servir de base para modificar aspectos en la técnica de la criopreservación que permitan reducir los efectos de la misma sobre los espermatozoides.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se ha dado un crecimiento acelerado en lo que a tecnología de la criopreservación se refiere y en aquellas derivadas de la criogenia, lo que ha implicado una herramienta terapéutica en la preservación de gametos para su aplicación en técnicas de reproducción dentro de la medicina actual.

Actualmente, existe un incremento en la demanda para la criopreservación de células sexuales masculinas debido a las posibles complicaciones de los tratamientos quirúrgicos y no quirúrgicos (como el uso de fármacos para quimioterapia y radioterapia), o incluso por causas relacionadas con técnicas de reproducción asistida.

Durante mucho tiempo se han utilizado las técnicas de congelación lenta que han dado una alternativa en la criopreservación. La aplicación de nuevas técnicas, ha dado lugar a una nueva exposición de las células sexuales a ambientes nunca antes experimentados, con el fin de preservar su función para un uso futuro. Sin embargo, los efectos a corto, mediano y largo plazo sobre estos gametos no han sido dilucidados del todo, y así como otros factores ambientales pueden dañar su función o estructura, las mismas técnicas de criopreservación pueden tener este efecto.

La criopreservación es parte fundamental de las técnicas de reproducción asistida por lo que creemos importante evaluar si genera cambios en el espermatozoide maduro que activen la cascada apoptótica y por tanto repercutan en el resultado de las técnicas de reproducción.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos:

- *Objetivo General:*
 - Analizar el efecto de la criopreservación en la inducción de marcadores apoptóticos en poblaciones espermáticas de pacientes infértiles.

- *Objetivos Específicos:*
 1. Comparar la inducción de marcadores apoptóticos que resultan del proceso de criopreservación en poblaciones espermáticas de pacientes infértiles.
 2. Comparar la inducción de marcadores apoptóticos que resultan del proceso de criopreservación en poblaciones espermáticas móviles e inmóviles de pacientes infértiles.
 3. Evaluar algunos de los mecanismos apoptóticos desarrollados a través del mecanismo de congelación en este tipo de muestras.

Hipótesis:

- El semen de pacientes infértiles en poblaciones espermáticas de alta y baja movilidad muestra mayor cantidad de marcadores apoptóticos que el semen de pacientes fértiles después de realizar técnicas de criopreservación.

- La criopreservación-descongelamiento de la muestra seminal induce la apoptosis en espermatozoides maduros.

Diseño del Estudio

Tipo de Investigación:

Experimental.

Tipos de Diseños:

Estudio Transversal.

Características del Estudio:

Analítico, Prospectivo y Transversal.

Criterios de Inclusión y Exclusión

-Pacientes Infértiles:

Inclusión:

- Pacientes con 1 año de búsqueda intencionada de embarazo sin factor femenino asociado que autoricen su participación.
- Pacientes con diagnóstico de infertilidad basado en los criterios de la OMS, con excepción, para fines de este estudio y por la metodología del mismo, de pacientes con oligozoospermia, ya que solo se incluyeron pacientes con una concentración espermática total mayor a 80×10^6 .
- Espermocultivo negativo.
- Muestra seminal con cuenta leucocitaria menor a 1×10^6 /ml.

Exclusión:

- Pacientes con trastornos eyaculatorios.
- Pacientes con eyaculación retrógrada.
- Pacientes con menos de 3 días y más de 6 días de abstinencia sexual.
- Pacientes que se encuentran con medicación sistémica.
- Pacientes con enfermedad sistémica.

-Pacientes Fértiles:

Inclusión:

- Pacientes donadores que autoricen su participación y firmen el consentimiento informado.
- Los pacientes deben demostrar embarazo de la pareja en un periodo menor a un año.
- Espermocultivo negativo.
- Muestra seminal con cuenta leucocitaria menor a 1×10^6 /ml.

Exclusión:

- Pacientes con trastornos eyaculatorios.
- Pacientes con eyaculación retrógrada.
- Pacientes con menos de 3 días y más de 6 días de abstinencia sexual.
- Pacientes que se encuentran con medicación sistémica.
- Pacientes con enfermedad sistémica.

Variables del Estudio

Independientes:

- Fertilidad.
- Infertilidad.
- Criopreservación-Descongelamiento.

Dependientes:

- Marcadores apoptóticos, concentración, movilidad y morfología.

Intervinientes:

- Edad.
- Toxicomanías.
- Enfermedades crónicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron los espermatozoides de pacientes fértiles (grupo control) e infértiles (grupo de estudio) que aceptaron participar en el estudio. Al ser una investigación piloto, el número de pacientes fue de 5 en el grupo de estudio y 3 en el grupo control. A partir del análisis de estos resultados, se obtendrá el tamaño de la muestra para continuar con el estudio y completarlo. Las muestras obtenidas de los pacientes (fértiles e infértiles) por masturbación tras 3-5 días de abstinencia sexual fueron capacitadas mediante técnica de gradientes de densidad para separar dos subpoblaciones de espermatozoides con alta y baja movilidad. Las dos subpoblaciones obtenidas de cada grupo (4 en total) fueron analizadas independientemente para determinarles su concentración, movilidad y morfología, además de analizarse con Anexina-V y anticuerpos anticaspasa-3 (como marcadores apoptóticos tempranos), con el método de TUNEL (como marcador apoptótico tardío) y con yoduro de propidio (como marcador de células necróticas). Posteriormente, se criopreservaron las muestras por 72 hrs. y posteriormente se descongelaron y fueron nuevamente valoradas en parámetros de concentración, movilidad, morfología y marcadores de apoptosis. Para la detección de marcadores apoptóticos, los espermatozoides marcados fueron analizados con el citómetro de flujo FC500.

Finalmente, se reportaron los porcentajes de células positivas como negativas para los marcadores Anexina-V, anticuerpos anticaspasa 3 y yoduro de propidio además de los positivos para el método de TUNEL y se compararon los resultados obtenidos entre el grupo control y los pacientes infértiles y entre los espermatozoides móviles y no móviles de cada grupo (control y estudio).

Parámetros Seminales (Concentración, Morfología y Movilidad).

Los pacientes colectaron una muestra de semen mediante masturbación en contenedores estériles después de 3 a 5 días de abstinencia sexual. La concentración espermática, la motilidad y morfología fueron evaluadas en la muestra original sin procesar y posterior a la criopreservación - descongelamiento de las muestras.

Después de licuefacción (30-45 minutos), 5µl de cada muestra fue colocada en una cámara de Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) y se leyó bajo el microscopio de luz para motilidad y concentración espermática.

La morfología se evaluó de acuerdo a los criterios estrictos de Kruger⁽⁴⁵⁾. Para ello, cada muestra (10µl) se extendió en un portaobjetos y se dejó secar por 20 minutos antes de teñirse con la tinción Diff-Quick (Baxter Dade Diagnostics, Dubingen, Switzerland), se leyó un promedio de 100 espermatozoides por extendido bajo microscopia de luz en objetivo de inmersión 100x.

De acuerdo a las características de la muestra se colocaron de 0.5 a 1.0 ml de los gradientes superior e inferior para realizar la separación seminal en espermatozoides móviles y no móviles (este procedimiento se realiza de manera rutinaria en el laboratorio para separar los espermatozoides que se consideran de mayor calidad según los criterios estrictos de Kruger en cuanto a morfología y de la OMS en cuanto a concentración y movilidad). El semen se colocó en la parte superior de la concentración del gradiente y fue centrifugado a 400 g durante 15 minutos. Después de la centrifugación, las 2 subpoblaciones de espermatozoides con alta y baja movilidad fueron recuperadas. Ambas fases recuperadas fueron resuspendidas en medio HTF (fluido tubárico humano, Irvine Scientific, Santa Ana, CA) adicionado con 10% de suplemento sérico y cada muestra se llevó a una concentración aproximada de 1×10^6 espermatozoides por mililitro y posteriormente se evaluará nuevamente la concentración, motilidad y morfología espermática.

Las muestras se mantuvieron a 37°C, 5%CO₂ en medio HFT y fueron analizadas independientemente para Anexina V, anticuerpos anti-caspasa 3 y yoduro de propidio además de método de TUNEL en la siguiente media hora.

Evaluación de la translocación de fosfatidil-serina en la membrana plasmática

La anexina V es una proteína dependiente de calcio con una alta afinidad por la fosfatidilserina (FS), la cual refleja eventos apoptóticos tempranos. La unión de anexina V a células apoptóticas típicamente muestra una tinción verde fluorescente. El yoduro de propidio (tinción roja) fue agregado para diferenciar células viables de las necróticas, permitiendo diferenciar las células con translocación de fosfatidilserina que están muertas y después aquellas vivas con y sin translocación de fosfatidilserina.

Después de la separación, se lavaron 10⁶ células de cada muestra (móvil y no móvil) en PBS (buffer de solución salina fosfatada) y se centrifugó la muestra a 200 x g por 5 minutos. Las muestras fueron resuspendidas en 100 µl de una solución que contiene Anexina-V marcada con fluoresceína además de IP (la solución se prepara prediluyendo 20µ de Anexina-V-fluoresceína en 1 ml del buffer de incubación adicionando 20µ de la solución de IP) y se incubaron por 10-15 minutos a una temperatura de 15-25 °C.

Finalmente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo previa adición de 0.5 ml de un buffer de incubación por 10⁶ células. En el citómetro de flujo, las muestras se leyeron a 488nm con un filtro de 515nm para la detección de Anexina-V-fluoresceína y un filtro de más de 600nm para la detección de PI (yoduro de propidio). Se requiere compensación electrónica del instrumento para evitar traslapaciones de los dos espectros emitidos.

Detección de caspasa-3 activada

La familia de las caspasas juega un papel importante en la apoptosis. La caspasa-3 es una enzima clave que se activa mediante proteólisis por parte de otra proteasa durante las etapas tempranas del proceso apoptótico, y que como otros miembros de las caspasas se sintetiza de forma inactiva. La caspasa-3 activada, un marcador de las células que presentan apoptosis, tiene la función de activar una dioxirribonucleasa capaz de producir fragmentaciones en el DNA por lo que su detección mediante anticuerpos monoclonales es otra vía de detección de la apoptosis en sus etapas iniciales. Un anticuerpo vs la proteína CD45 fue agregado para identificar las células leucocitarias. La proteína CD 45 es un antígeno específico de la membrana de los leucocitos, lo que permite su identificación y diferenciación de los espermatozoides.

Las muestras previamente separadas, fueron lavadas en dos ocasiones con PBS (buffer de fosfato salino) frío y posteriormente resuspendidas utilizando la solución del Kit Cytifix/Cytoperm™ (la solución contiene un buffer de solución salina con pH neutral, saponina y 4% de paraformaldehído) a una concentración de 1×10^6 células/0.5 ml. Posteriormente, las muestras fueron incubadas por 20 minutos en hielo.

Al terminar, el paquete celular fue lavado en dos ocasiones con el Buffer Perm/Wash™ con un volumen de 0.5ml de buffer/ 1×10^6 células a temperatura ambiente, y se desechó la solución del Kit Cytifix/Cytoperm™.

Se determinó la cantidad total de muestras y se calculó la cantidad de buffer y anticuerpos marcados con PE (ficoeritrina) que se necesitó para que cada muestra tenga 100 μ l del buffer Perm/Wash™ y 20 μ l de la solución que contiene anticuerpos monoclonales anticaspasa-3.

Se resuspendieron las células en el buffer Perm/Wash™ y en los anticuerpos en la cantidad ya determinada y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavó cada muestra en 1.0 ml. del buffer Perm/Wash™ y se resuspendió la muestra en 0.5 ml del buffer Perm/Wash™.

Las muestras obtenidas se analizaron por citometría de flujo con el uso del citómetro FC500, y se reportaron los porcentajes de células positivas y negativas para los anticuerpos anticaspasa-3.

Evaluación de apoptosis mediante el método de TUNEL

Uno de los eventos tardíos de la cascada apoptótica es la activación de endonucleasas endógenas que genera fragmentaciones en el DNA. El método llamado TUNEL es capaz de detectar éste tipo de células mediante la adición de una enzima terminal de desoxinucleotidil transferasa (TdT) para la incorporación de desoxinucleótidos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Para realizar el método de TUNEL el cual requiere de dos etapas (fijación y tinción) utilizamos el kit APO-DIRECT. El kit incluye 5 ml de suspensiones celulares control tanto positivas como negativas, de aproximadamente 1×10^6 células por ml en etanol 70% (v/v). Las células control se derivan de una línea celular de linfoma humano y han sido fijadas como se fijarán las células muestra que se explica a continuación.

Fijación: Se comienza el procedimiento al resuspender las células en PBS-paraformaldehído 1% a una concentración de $1-2 \times 10^6$ células/ml y colocar la suspensión celular en hielo por 30-60 min. Después, se centrifugan las células durante 5 min a $300 \times g$ y se desecha el sobrenadante. A continuación, se lavan las células en 5 ml. de PBS y se centrifuga para obtener el paquete celular (este paso se realizará en dos ocasiones). Posteriormente se resuspende el paquete celular en el PBS residual mediante agitación moderada en vortex. Se ajusta la

concentración celular a $1-2 \times 10^6$ células/ml. en etanol al 70% (v/v) frío y se mantiene por un mínimo de 30 min. Finalmente, se almacenan las células en etanol al 70% (v/v) a -20°C hasta su uso.

Tinción y Análisis. Se resuspendieron las células control positivas y negativas (6552LZ, 6553LZ) en sus respectivos viales. Se tomó una alícuota de 1 ml de la suspensión de las células control (aprox. 1×10^6 células/1 ml) y se colocó en tubos de 12 x 75 mm para citometría de flujo. Se centrifugaron a $300 \times g$ por 5 min y se removió el etanol al 70% (V/V) por aspiración sin alterar el paquete celular. Se resuspendió cada tubo de células control con 1 ml del buffer de lavado (6548AZ), se centrifugó a $300 \times g$ por 5 min y se removió el sobrenadante. Se repitió el tratamiento de lavado y después, se resuspendió cada paquete celular control con 50 μl de la solución de tinción (contiene el buffer de reacción para la enzima TdT, la enzima TdT, fluoresceína conjugada con dUTP [6549AZ, 6554EZ, 6555EZ] y agua destilada). Posteriormente, se incubaron las células en la solución de tinción por 60 min a 37°C y al finalizar el periodo de incubación se añadió 1 ml. del buffer de enjuague (0.05% Azida de Sodio 6550AZ) a cada tubo, se centrifugó a $300 \times g$ por 5 min y se removió el sobrenadante por aspiración (en dos ocasiones). A continuación, se resuspendió el paquete celular en 0.5 ml del buffer de tinción con yoduro de propidio/RNasa (6551AZ) y se incubaron las células en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se analizaron las células en la solución de yoduro de propidio/RNasa por citometría de flujo después de 3 horas de concluir con la tinción.

Criopreservación y Descongelamiento

Se colocó en un tubo cónico, volumen a volumen de muestra seminal y medio de congelación (Test Yolk Buffer de Irving Scientific) que debe estar a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó la muestra en los criotubos, (máximo 1ml. por cada criotubo) los cuales deben estar perfectamente rotulados.

Se dejó la muestra por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente permaneció por el mismo tiempo en el refrigerador (4°C). Después, la muestra permaneció a -20°C por 10 minutos y se dejó por los mismos minutos en vapor de nitrógeno. Al finalizar este proceso se sumergió la muestra y se almacenó en nitrógeno líquido a -196 °C por 72 hrs. hasta su descongelación.

Para descongelar las muestras, se sacaron a temperatura ambiente por 10 min. y se pusieron en baño maría a 37°C por un periodo de 10-15 minutos. Posteriormente, se analizaron las muestras de la misma forma que antes de la criopreservación.

Análisis Estadístico

Se utilizaron pruebas paramétricas y no paramétricas para observar diferencias entre los grupos de estudio y control y entre sí mismos antes y después de la criopreservación. Se determinó que una diferencia era significativa cuando la p era igual ó menor a 0.05. Se utilizó el programa SPSS versión 12 para Windows para realizar el análisis del estudio.

- *Tamaño de la Muestra:* Al ser un estudio piloto, el número de pacientes requeridos fue de 5 pacientes en el grupo de estudio y 3 en el grupo control.

Recolección de Datos

Se capturaron los datos mediante citometría de flujo y se reportaron los porcentajes de células positivas y negativas para los anticuerpos anticaspasa-3. De igual forma, se reportaron los porcentajes de células positivas y negativas para las marcas Anexina V y PI positivas.

Prueba Piloto

Con muestras seminales criopreservadas se realizaron pruebas para estandarizar el citómetro de flujo y posteriormente analizar los resultados obtenidos.

Plan de Análisis

Se analizaron los resultados mediante citometría de flujo. Dependiendo de los datos recabados y de la normalidad que presenten estos, fueron analizados con pruebas paramétricas o no paramétricas.

Aspectos Éticos

Los pacientes que formaron parte del protocolo de investigación firmaron un consentimiento informado y autorizaron su participación en el estudio. Los participantes recibieron asesoría en cualquier momento y se les dio la oportunidad de renunciar al protocolo en el momento que ellos desearon. La participación de los voluntarios fue confidencial en todo momento.

RESULTADOS

Un total de 8 individuos fueron involucrados en un estudio control, en donde las muestras espermáticas de cada uno de ellas, fueron evaluadas en los parámetros seminales y posteriormente en la expresión de índices apoptóticos tempranos y tardíos. Los parámetros seminales de las muestras post-capacitación antes y después de la criopreservación (estratificadas en fracciones de alta y baja movilidad) se muestran en las tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. Parámetros seminales previo a la criopreservación.

Paciente	Edad (años)	Movilidad	Concentración (millones/ml)	Movilidad (% A+B)	Morfología (%)
Grupo Estudio					
1	33	Alta	26	79	10
		Baja	32	21	6
2	30	Alta	38	69	8
		Baja	82	9	4
3	36	Alta	50	90	10
		Baja	61	13	5
4	29	Alta	127	95	9
		Baja	111	64	5
5	37	Alta	57	85	8
		Baja	109	20	4
Grupo Control					
6	29	Alta	107	81	18
		Baja	93	34	12
7	31	Alta	159	82	26
		Baja	94	40	10
8	31	Alta	84	84	10
		Baja	98	14	6

Tabla 2. Parámetros seminales posterior a la descongelación espermática					
Paciente	Edad (años)	Movilidad	Concentración (millones/ml)	Movilidad (% A+B)	Morfología (%)
Grupo Estudio					
1	33	Alta	12	14	4
		Baja	22	6	2
2	30	Alta	51	28	4
		Baja	118	10	5
3	36	Alta	52	68	5
		Baja	48	8	5
4	29	Alta	101	65	13
		Baja	75	2	15
5	37	Alta	68	29	7
		Baja	50	0	7
Grupo Control					
6	29	Alta	87	62	22
		Baja	73	8	14
7	31	Alta	121	62	14
		Baja	73	22	8
8	31	Alta	102	65	17
		Baja	73	4	14

Parámetros Seminales (Concentración, Morfología y Movilidad).

Las características en los parámetros seminales (concentración, movilidad y morfología) entre los grupos de estudio y control antes y después de la congelación pueden ser observadas en la tabla 4. Al evaluar la concentración espermática se encontraron diferencias significativas ($p=0.009$) cuando se compararon las fracciones de alta movilidad antes del proceso de criopreservación entre el grupo de estudio y el grupo control (59.6 ± 39.48 vs 116.66 ± 38.4). Al mismo tiempo, se observó significancia estadística ($p=0.0001$) en la concentración espermática en las fracciones de baja movilidad posterior a la criopreservación entre el grupo de estudio y el grupo control (62.6 ± 36.2 vs 73 ± 0.1).

Evaluando las condiciones de movilidad y por diseño de estudio, se encontraron diferencias entre las fracciones de alta y baja movilidad antes de la

criopreservación ($p=0.0007$) en ambos grupos (estudio y control). Al mismo tiempo, se expresaron las mismas diferencias en las fracciones de alta y baja movilidad posteriores al proceso de criopreservación en estos mismos grupos ($p<0.05$).

Al evaluar los parámetros morfológicos, se encontraron diferencias entre las fracciones de alta y baja movilidad en el grupo de estudio antes de la criopreservación. También se observó una morfología significativamente más baja ($p=0.03$) en la fracción de alta movilidad del grupo de estudio antes de la criopreservación, al compararse con la misma fracción del grupo control (9.0 ± 1.0 vs 18.0 ± 8.0). Esta misma variación se mostró significativa ($p=0.01$) en la fracción de baja movilidad antes de la criopreservación entre el grupo de estudio y su control (4.8 ± 0.83 vs 9.3 ± 3.05).

Tabla 3. Características de los parámetros seminales entre grupos de estudio antes y después de la congelación.

	Concentración			
	Estudio		Control	
	Alta movilidad	Baja movilidad	Alta movilidad	Baja movilidad
Precongelación	59.6 ± 39.4	79 ± 33.4	116.6 ± 38.4 ^Ж	95 ± 2.6
Descongelado	56.8 ± 32.1	62.6 ± 36.2	103.3 ± 17.3	73 ± 0 ^Ю

	Movilidad			
	Estudio		Control	
	Alta movilidad	Baja movilidad	Alta movilidad	Baja movilidad
Precongelación	83.6 ± 10.0	25.4 ± 22.1	82.3 ± 1.5	29.3 ± 13.6
Descongelado	40.8 ± 24.2 ^Д	5.2 ± 4.1 ^Л	63 ± 1.7 ^Д	11.3 ± 9.1 ^Л

	Morfología			
	Estudio		Control	
	Alta movilidad	Baja movilidad	Alta movilidad	Baja movilidad
Precongelación	9 ± 1 ^Ї	4.8 ± 0.8 ^Б	18 ± 8 ^Ї	9.3 ± 3.0 ^Б
Descongelado	6.6 ± 3.7	6.8 ± 4.9	17 ± 4.0	12 ± 3.4

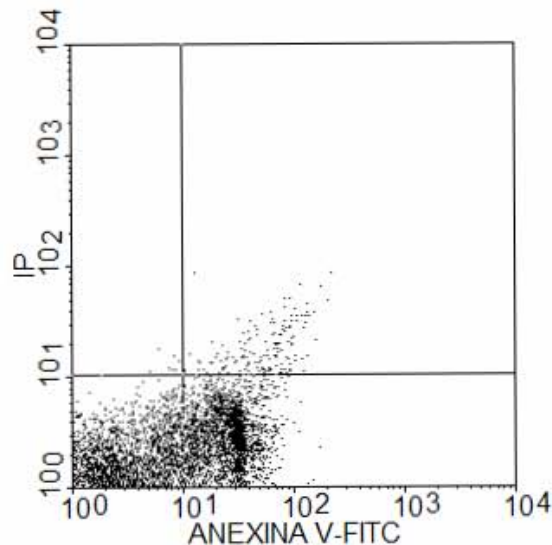
^Ж=Diferencia significativa en la concentración entre el grupo de estudio y control antes de la congelación. ^Ю=Diferencia significativa de la concentración en la fracción de baja movilidad entre los grupos de estudio y control. ^Л=Diferencia significativa en la movilidad entre las fracciones de alta y baja movilidad después de la congelación. ^Д=Diferencia significativa en la movilidad en la fracción de alta movilidad antes de la congelación. ^Ї=Diferencia significativa en la morfología entre las fracciones de alta y baja movilidad. ^Б=Diferencia significativa en la morfología en la fracción de baja movilidad entre los grupos de estudio.

Evaluación de la translocación de fosfatidil-serina en la membrana plasmática

La anexina V es una proteína dependiente de calcio con una alta afinidad por la fosfatidilserina (FS), la cual refleja en forma inicial cambios apoptóticos de membrana. La unión de anexina V a las células apoptóticas, típicamente muestra una tinción verde fluorescente debido al FITC. El yoduro de propidio (tinción roja) fue agregado para diferenciar células viables de las necróticas. En la figura 1, se observa una gráfica dividida en cuadrantes con la utilización de citómetro de flujo. El cuadrante superior izquierdo es aquel que corresponde a las células IP positivas Anexina V negativas. El cuadrante superior derecho es aquel que corresponde a células IP positivas Anexina V positivas. Estos dos cuadrantes reflejan las células necróticas. El cuadrante inferior izquierdo refleja las células IP Anexina V negativas es decir los espermatozoides que expresan vitalidad. Finalmente, el cuadrante inferior derecho refleja las células positivas para Anexina V negativas para IP, lo que significa que éstas son las células que están sufriendo el primer paso de la apoptosis diferenciándolas de las ya necróticas.

Finalmente, el cuadrante inferior derecho refleja las células positivas para Anexina V negativas para IP, lo que significa que éstas son las células que están sufriendo el primer paso de la apoptosis diferenciándolas de las ya necróticas.

Figura 1.



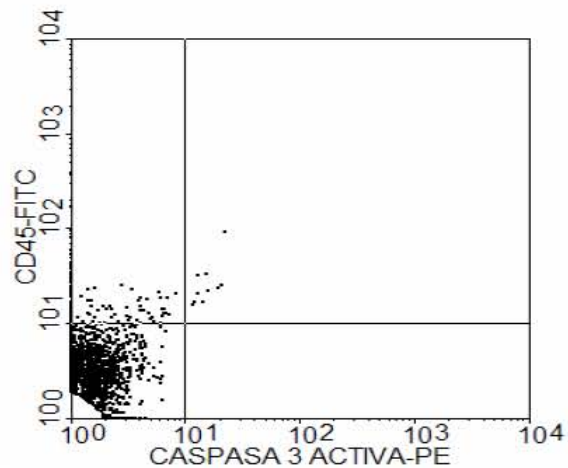
El promedio de células germinales positivas para Anexina V entre los grupos de estudio antes y después de la criopreservación y descongelamiento de las muestras seminales se reporta en la tabla 4, y se observa en la gráfica 1 y 2. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el índice de positividad para Anexina V en las fracciones espermáticas de baja movilidad entre el grupo de estudio y el grupo control antes de la criopreservación (31.14 ± 6.06 vs 21.1 ± 1.75). De igual forma, estas diferencias ($p < 0.05$) fueron expresadas en el índice de positividad para Anexina V en la fracción de alta movilidad del grupo control antes y después del proceso de criopreservación (23.3 ± 2.3 vs 30.4 ± 0.53).

Detección de caspasa-3 activada

La familia de las caspasas juega un papel importante en los procesos de muerte celular programada. La caspasa-3 activada (caspasa-3a) es la enzima efectora más importante para la inducción de endonucleasas con la posterior fragmentación en oligonucleosomas. Junto con lo mencionado anteriormente se utilizó anticuerpo anti-CD45 para aislar aquellas células leucocitarias.

Los resultados demostrados por el citómetro de flujo en relación al índice de células positivas para caspasa-3a se demuestran en la figura 2. En esta figura se observa una gráfica dividida en cuadrantes. El cuadrante superior izquierdo es aquel que corresponde a las células CD45 positivas Caspasa-3a negativas. El cuadrante superior derecho es aquel que corresponde a células CD45 positivas Caspasa-3a positivas. Estos dos cuadrantes están compuestos por leucocitos tanto viables (cuadrante superior izquierdo) como apoptóticos (cuadrante superior derecho). El cuadrante inferior izquierdo muestra las células CD45 Caspasa-3a negativas, es decir los espermatozoides viables. Finalmente, el cuadrante inferior derecho refleja las células positivas para Caspasa-3a negativas para CD45, lo que significa que éstas son las células que están sufriendo el primer paso de la apoptosis diferenciándolas de los leucocitos gracias a un marcador de membrana específico de los mismos (CD45).

Figura 2.



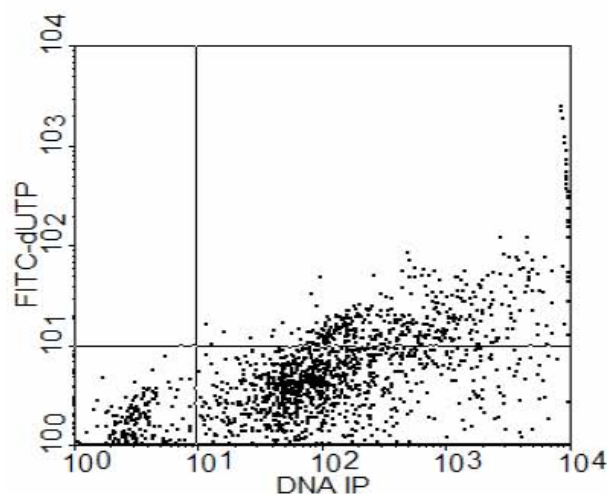
El promedio de células positivas para Caspasa-3a entre los grupos de estudio antes y después de la criopreservación y descongelamiento de las muestras seminales se reporta en la tabla 4, y se observa en la gráfica 1 y 2. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el índice de positividad para Caspasa-3a en la fracción de alta movilidad del grupo de estudio antes y después de la criopreservación de las muestras (0.32 ± 0.40 vs 0.56 ± 0.19). De igual forma, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el índice de positividad para Caspasa-3a en las fracciones espermáticas de alta movilidad entre el grupo de estudio y el grupo control antes de la criopreservación (31.14 ± 6.06 vs 21.1 ± 1.75).

Evaluación de apoptosis mediante el método de TUNEL

Uno de los eventos tardíos de la cascada apoptótica es la activación de endonucleasas endógenas que genera fragmentación en el ADN, formando oligonucleosomas. El método denominado como TUNEL es capaz de detectar éste tipo de células mediante la adición de una enzima terminal de desoxinucleotidil transferasa (TdT) para la incorporación de desoxinucleótidos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

La presencia de espermatozoides positivos para TUNEL refleja el porcentaje de espermatozoides en apoptosis en su fase tardía, Figura 3. En esta figura, se observa una gráfica en cuadrantes, en donde los dos superiores corresponden a los espermatozoides positivos para TUNEL y los dos inferiores corresponden a las células germinales viables.

Figura 3.



El promedio de células positivas para TUNEL entre los grupos de estudio antes y después de la criopreservación y descongelamiento de las muestras seminales se reporta en la tabla 4 y se observa la gráfica 1 y 2. Se observó una discreta diferencia significativa ($p=0.06$) en el índice de positividad para TUNEL en la fracción de alta movilidad del grupo de estudio antes y después de la criopreservación de las muestras (1.86 ± 1.67 vs 1.94 ± 1.02). De igual forma, se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) en el índice de positividad para TUNEL en las fracciones espermáticas de alta movilidad entre el grupo de estudio y el grupo control antes de la criopreservación (1.86 ± 1.67 vs 5.77 ± 0.33). Finalmente, se encontró una diferencia significativa ($p<0.05$) en el índice de positividad para TUNEL en la fracción de baja movilidad del grupo de estudio antes y después de la criopreservación de las muestras (1.94 ± 1.02 vs 7.22 ± 1.24).

Tabla 4. Indicadores apoptóticos de membrana entre los grupos de estudio antes y después de la congelación.

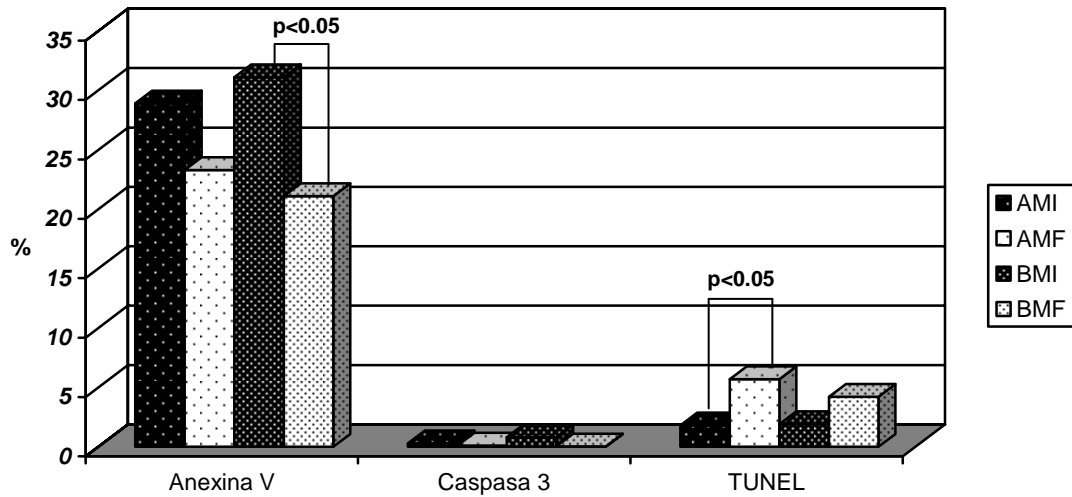
Anexina V				
	Estudio		Control	
	Alta movilidad	Baja movilidad	Alta movilidad	Baja movilidad
Precongelación	28.9 ± 6.4	31.4 ± 6.0	23.3 ± 2.3	21.1 ± 1.7 ^{†‡}
Descongelado	30.9 ± 4.0	30.5 ± 6.1	30.4 ± 0.5 [¥]	30 ± 3.3

Caspasa 3^a				
	Estudio		Control	
	Alta movilidad	Baja movilidad	Alta movilidad	Baja movilidad
Precongelación	0.32 ± 0.4	0.84 ± 1.1	0.1 ± 0.1 [‡]	0.03 ± 0.05
Descongelado	0.56 ± 0.19 ^Δ	0.16 ± 0.13	0.16 ± 0.2	0.23 ± 0.23

TUNEL				
	Estudio		Control	
	Alta movilidad	Baja movilidad	Alta movilidad	Baja movilidad
Precongelación	1.86 ± 1.67	1.94 ± 1.02	5.77 ± 0.33 [£]	4.26 ± 4.02
Descongelado	4.82 ± 2.61 [€]	7.22 ± 1.24 ^Ω	6.13 ± 4.48	8.53 ± 2.75

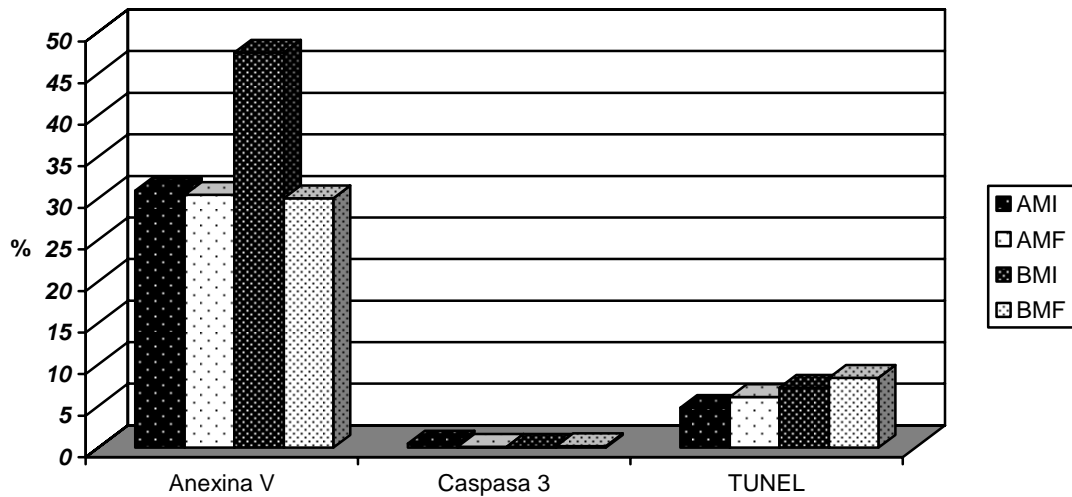
†= Diferencia significativa entre las fracciones de baja movilidad en el grupo de estudio y el grupo control (p=0.03). ¥= Diferencia significativa en la fracción de alta movilidad antes y después de la congelación (p=0.006). Δ= Diferencia significativa en la fracción de alta movilidad antes y después de la congelación (p=0.02). ‡= Diferencia significativa entre las fracciones de alta movilidad entre los grupos de estudio y control antes de la congelación (p=0.003). €= Diferencia significativa en la fracción de alta movilidad después de la descongelación (p=0.06). £= Diferencia significativa entre las fracciones de alta movilidad entre los grupos de estudio y control antes de la congelación (p=0.008). Ω=Diferencia significativa en la fracción de baja movilidad posterior a la descongelación en el grupo de estudio (p=0.001)

Gráfica 1. Comparativo entre índices apoptóticos antes de la criopreservación.



AMI: Fracción de alta movilidad en pacientes infértiles, AMF: Fracción de alta movilidad en pacientes fértiles, BMI: Fracción de baja movilidad en pacientes infértiles, BMF: Fracción de baja movilidad en pacientes fértiles.

Gráfica 2. Comparativo de los índices apoptóticos después de la criopreservación.



AMI: Fracción de alta movilidad en pacientes infértiles, AMF: Fracción de alta movilidad en pacientes fértiles, BMI: Fracción de baja movilidad en pacientes infértiles, BMF: Fracción de baja movilidad en pacientes fértiles.

DISCUSIÓN

Con base en la literatura internacional existente, este es el primer estudio que evalúa la secuencia en los mecanismos de activación para los procesos de muerte celular programada en muestras criopreservadas tanto en pacientes fértiles como en aquellos con un grado importante de asteno-teratozoospermia. La criopreservación espermática ha sido asociada en forma importante a las técnicas de reproducción asistida incluso, mucho antes de la aparición de la FIV y la implementación en técnicas de micromanipulación como el ICSI. En términos generales, es conocido el efecto que tienen los mecanismos apoptóticos en el espermatozoide de pacientes con cierto grado de disfunción en la fertilidad ^(9,12,46), lo que se manifiesta con cambios en la calidad espermática dentro de los procesos reproductivos ⁽¹³⁾.

A pesar de la limitada información contenida en este tópico, diversos esfuerzos han sido llevados a cabo con el objeto de definir el impacto que tienen las técnicas de criopreservación en el espermatozoide humano ^(33,47-48). La base para el entendimiento de estos procesos de auto-limitación y selección en células tanto somáticas como germinales, es explorada en sus fases tardías con cambios bien definidos de desnaturalización y fragmentación en oligonucleosomas del material genético ^(9,49). En forma más reciente, se han descrito cambios en la composición de la membrana ⁽⁵⁰⁾ y la activación de efectores centrales relacionados con la activación de caspasas ⁽⁵¹⁾, con la consecuente derivación en la actividad nuclear dentro de la célula.

La fase inicial de este estudio ha puesto de manifiesto la interrelación que existe entre la maquinaria apoptótica y los espermatozoides, que aunque evidente, no había sido demostrada del todo en el espermatozoide humano y sobre todo, al ser sometido a los procesos de congelación/descongelación.

Por definición de nuestro estudio, se demostraron diferencias significativas en la movilidad y la concentración espermática, puesto de manifiesto en aquellos individuos con algún grado de infertilidad. Por otro lado, el deterioro en la expresión morfológica del espermatozoide se hace evidente en la población infértil del estudio, lo cual ha sido señalado previamente como falla dentro de los procesos de fertilización y desarrollo embrionario⁽⁴⁹⁾. Cabe señalar la relación de estos parámetros morfológicos encontrados en el estudio con el deterioro en las condiciones de movilidad ⁽⁵⁰⁾.

La fragmentación del ADN ^(9,53-54), la translocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática^(47,55-56) y más recientemente la activación de las caspasas han sido demostradas^(48,57) como características típicas de los mecanismos de muerte celular programada en células somáticas y espermatozoides⁽⁵⁸⁻⁵⁹⁾. Éstas características son reguladas en tres niveles: i) membrana plasmática (con la presencia de receptores para Fas), ii) membrana nuclear (con la presencia de p53 y la activación para el gen Bax y la desactivación en la expresión de Bcl-2) y iii) citoplasma (con la activación de Bax y la liberación del citocromo-c y con la activación de la cascada de las caspasas) ^(15,60).

Una de las grandes limitantes en la cuantificación de marcadores apoptóticos es el grado de celularidad necesario para la utilización de diversas técnicas con el uso específico del citómetro de flujo. Lo anterior, explica que los datos encontrados en la literatura, son provenientes de un “acumulado celular” de un grupo de pacientes que, a pesar de contar con ciertos criterios de inclusión, presentan una variabilidad inter-ensayo importante ^(57,61-62). Nuestra población de estudio proviene de muestras individuales, lo que otorga diferencias más perceptibles en el estudio con un grado de cuantificación mayor. Por otro lado, no existen datos perceptibles en la variabilidad intra-ensayo ya que este es el primer estudio en donde se cuantifica el efecto de muerte celular antes y después de la criopreservación en un mismo individuo.

Diversos estudios han llevado a cabo la cuantificación de caspasa 3 en sus formas activa e inactiva. Sin embargo, solo han sido detectados niveles bajos de procaspasa-3 con una amplia variabilidad en fracciones de alta movilidad en pacientes fértiles e infértiles sin poder demostrar la presencia de caspasa 3a. ⁽⁵⁷⁾. A diferencia de estos, nuestros datos sugieren la presencia de caspasa 3a antes del proceso de criopreservación, tanto en fracciones de alta como de baja movilidad en pacientes fértiles e infértiles. Se encontró que la expresión de caspasa-3a es significativamente mayor en la población infértil contra su control. Además, también encontramos que en la fracción de alta movilidad en pacientes infértiles hay un incremento en la expresión de caspasa 3a, lo que sugiere la activación de mecanismos intracitoplásmicos que son iniciados en forma más susceptible en este grupo de población y que han sido sugeridos previamente ⁽⁶¹⁾.

Se ha demostrado que las células espermáticas provenientes de sujetos infértiles, contienen una gran cantidad de alteraciones nucleares, algunas de ellas incluyen alteraciones en la estructura de la cromatina, aneuploidismo, microdeleciones cromosomales y ruptura en las cadenas de ADN ^(9,46,53,63-64). Diversas teorías han sido propuestas para explicar el origen en el daño nuclear dentro del espermatozoide ^(12,53). Una de las teorías refiere que el daño al ADN puede estar dado desde los procesos de empaquetamiento durante la transición del complejo de histonas a protaminas durante la espermiogénesis. Por otra parte, otra de las teorías se basa en el daño directo al ADN originado por procesos oxidativos (daño nuclear asociado a la depleción de antioxidantes, tabaquismo, xenobioticos, exposición al calor, contaminación por leucocitos y la presencia de iones en medios de cultivo espermático).

Numerosos estudios han demostrado una asociación entre la pobre calidad espermática con el incremento en la presencia de alteraciones cromosómicas, disminuyendo el potencial reproductivo documentado en casos relacionados con inseminación intrauterina o ICSI. ⁽⁶⁵⁻⁶⁸⁾.

En un elegante estudio realizado por Paash ⁽⁴⁸⁾, en donde se incluyeron la determinación de caspasas 3, 8 y 9 junto al potencial de membrana mitocondrial y el daño nuclear cuantificado por TUNEL, no se evidenciaron cambios en este último al valorar diferentes muestras criopreservadas, lo cual ha sido expuesto con anterioridad ⁽³³⁾. Sin embargo, en nuestro estudio se observó que la detección de daño por fragmentación mostró diferencias entre las fracciones de alta movilidad en los grupos de estudio y control, y más aún, en las muestras descongeladas por ambos grupos de movilidad en aquellos sujetos infértiles.

El espermatozoide humano ha mostrado marcadores apoptóticos similares a los encontrados en las células somáticas, en donde se demuestran diversos niveles de externalización de fosfatidilserina^(12,47,57,69). Estos cambios de membrana junto con el daño en el ADN han sido evidenciados con mayor frecuencia en fracciones de baja movilidad (en donde condiciones de dismorfismo y disfuncionalidad son encontrados) cuando son comparados con fracciones de alta movilidad. ^(12,57).

En este contexto, la expresión de anexina V para la evaluación de la membrana plasmática mostró diferencias importantes en las mismas fracciones de baja movilidad entre sujetos fértiles e infértiles previo al proceso de criopreservación, dejando establecido en los cambios estructurales de membrana ya previamente determinados. Por otro lado, se observó un incremento en la expresión de este marcador en pacientes con fertilidad probada cuando la fracción de alta movilidad es expuesta a este evento. Esto parece definir una mayor susceptibilidad de los fosfolípidos de la bicapa membranal en el espermatozoide fértil que en aquel con algún daño previamente establecido.

Queda por determinar las condiciones de interacción entre cada uno de los mecanismos expuestos, es evidente que los datos arrojados por el presente estudio sentarán un precedente importante sin menospreciar la realización de estudios ulteriores para su entera definición.

CONCLUSIONES

El campo interactivo entre la criobiología y los procesos reproductivos ha marcado una pauta importante en la preservación de las especies y específicamente en el ser humano. Los eventos relacionados con el status de infertilidad en el hombre, han requerido de un entendimiento preciso para definir el efecto de esta condición en los mecanismos de criopreservación y que pudieran variar de aquellas muestras seminales provenientes de pacientes sanos. En forma objetiva, cuantificable y reproducible, este estudio da de manifiesto bases en el entendimiento molecular de estos procesos y su posible aplicación al campo clínico que permitirá una evaluación objetiva de los procesos y técnicas que el día de hoy llevamos a cabo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thompson EB. Special topic: Apoptosis. *Ann Rev Physiol* 1998;60:525-532.
2. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
3. Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Ann Rev Physiol* 1998;60:533-573.
4. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Ann Rev Physiol* 1998;60:601-617.
5. Print, CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000; 22:423-430.
6. Kierzenbaum, AL. Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive. *Mol Reprod Dev* 2001;58:1-3.
7. Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LL, Kim ED. In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997;68:1065-1069.
8. Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS. Spontaneous germ cell apoptosis in human: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:152-156.
9. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA In Situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis in somatic cells. *Exp Cell Res* 1993;207:202-205.
10. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28:587-96.
11. Han-Ming S, Jun D, Sin-Eng C, Alvin L, Choon-Nam O. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002;17:1266-1273.
12. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1338-1344.
13. Oosterhuis G, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lamblak CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000;74:245-250.
14. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281:1312-6.
15. Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:20049-52.
16. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Ann Rev Biochem* 1999;68:383-424

17. Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 1997;22:388–393.
18. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N 1998 Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998;17:3237–3245.
19. Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, Tsuruo T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 1997;14:1007–1012.
20. Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1997;138:1379–1394.
21. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K. Yama/ CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995;81:801–809.
22. Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA. Cleavage of lamin A by Mch2 but not CPP32: multiple interleukin 1-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8395–8400.
23. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43–50.
24. Liu X, Li P, Widlak P. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8461–8466.
25. Halenbeck R, MacDonald H, Roulston A, Chen TT, Conroy L, Williams LT CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol* 1998;8:537–540.
26. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
27. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999;423:103–11.
28. Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997;18:294–301.
29. Banks S, King SA, Irvine DS. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;129:505–14.
30. Morris I. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002;25:255-61.
31. Sailer BL, Jost LK, Erickson KR. Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Environ Mol Mutagen* 1995;25:23–30.
32. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 2002;23:717–23.
33. Duru NK, Mahmood M, Schuffner A, Oehninger S. Criopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil Steril* 2001;75: 263-268.

34. Critser JK, Arneson BW, Asker DV, Huse-Benda AR, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Post-thaw chronology on motility and on zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril* 1987;47:980–4.
35. McLaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1992;95:527–34.
36. Centola GM, Raubertas RM, Mattox H. Cryopreservation of human semen: comparison of cryoprotectives, sources of variability and prediction of post-thaw survival. *J Androl* 1992;13:283–8.
37. Woolley DM, Richardson DW. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *J Reprod Fertil* 1978;53:389–94.
38. Keel BA, Webster BW, Roberts DK. Effect of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987;81:213–20.
39. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis S.E. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001;16:1191.
40. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa: the effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* 1988;50:314–20.
41. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode for sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1992;13:232–41.
42. Alvarez JG, Storey BT. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectants. *J Androl* 1993;12:199–209.
43. Bell M, Wang R, Hellstron WJG, Sikka SC. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J Androl* 1993;14:472–8.
44. Sion B, Janny L, Boucher D, Grizard G. Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa. *Int J Androl* 2004;27:108-114.
45. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;49:112-117.
46. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69:528-532.
47. Schuffner A, Morshedi M, Oehninger S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. *Hum Reprod* 1998;16:2148-2153.

48. Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ, et al. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 2004;71:1828-1837.
49. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1997;56:602-607.
50. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. *J. Immunol. Methods*. 1995;184:39-51.
51. Parvathani LK, Buescher ES, Chacon-Cruz E, Beebe SJ. Type I cAMP-dependent kinase delays apoptosis in human neutrophils at a site upstream of caspase-3. *J Biol Chem* 1998;273:6736-6743.
52. Oehninger S, Acosta R, Morshedi M, Philput C, Swanson RJ, Acosta AA. Relation between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up fractions. *J Androl* 1990;11:446-452.
53. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1999;4:31-37.
54. Sakkas D, Moffat O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002;66:1061-1067.
55. Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol. Hum Reprod* 1999;5:109-115.
56. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Enrichment of nonapoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Banking* 2001;2:127-133.
57. Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8:984-991.
58. Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, Peter ME. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase 8/b. *J Biol Chem* 1997;272:26953-26958.
59. Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003;7:469-476.
60. Selivanova G, Wiman KG. p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv Cancer Res* 1995;66:143-180.
61. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003;24:246-252.

62. Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, et al. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod* 2004;10:825-834.
63. Manicard GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A₃ accessibility. *Biol Reprod* 1995;52:864-867.
64. Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey MV. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified Comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996;2:613-619.
65. Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2084-92.
66. Burrello N, Vicari E, Shin P, Agarwal A, De Palma A, Grazioso C, D'Agata R, Calogero AE. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod* 2003;18:1371-6.
67. Liu DY, Garrett C, Baker HW. Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in in vitro fertilization--embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. *Fertil Steril* 2004;82:1251-63.
68. Petit FM, Frydman N, Benkhalifa M, Le Du A, Aboura A, Fanchin R, Frydman R, Tachdjian G. Could sperm aneuploidy rate determination be used as a predictive test before intracytoplasmic sperm injection? *J Androl* 2005;26:235-41.
69. Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gaviño F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 2006;85:149-54.