



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

*Determinación de la fragmentación del ADN espermático y apoptosis en semen congelado de donantes de banco de semen y pacientes infértiles por las técnicas de congelación rápida y convencional.*

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**BIÓLOGO**  
PRESENTA

JONATHAN OMAR SÁNCHEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS

**M. en C. Pedro Cuapio Padilla**  
HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida,  
Hospital Español

ASESORA INTERNA

**Dra. Patricia Rosas Saucedo**

Unidad de Investigación en biología de la reproducción,  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM



Cd. De México.

Agosto, 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

*Determinación de la fragmentación del ADN espermático y apoptosis  
en semen congelado de donantes de banco de semen y pacientes  
infértiles por las técnicas de congelación rápida y convencional.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**

PRESENTA

JONATHAN OMAR SÁNCHEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS

**M. en C. Pedro Cuapio Padilla**

HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida,  
Hospital Español

ASESORA INTERNA

**Dra. Patricia Rosas Saucedo**

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción,  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

AGRADECIMIENTO A LAS INSTITUCIONES



HISPAREP, CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DEL  
HOSPITAL ESPAÑOL - HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO, SSA



POR SU APOYO Y COLABORACIÓN EN LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO DE  
INVESTIGACIÓN

## Agradecimientos

---

Al **M. en C. Pedro Cuapio Padilla**, por la confianza depositada en mí, por compartir su conocimiento, por su humildad y docencia ejemplar, pero sobre todo por brindarme su amistad. Ha sido un privilegio trabajar con usted.

A la **Dra. Patricia Rosas Saucedo**, por sus conocimientos transmitidos, su interés y colaboración en el proyecto que perfeccionaron este trabajo de investigación. Gracias a su tolerancia en mi insistencia fue posible adentrarme en el fascinante mundo de la reproducción.

Al **Dr. Mario Adán Moreno Eutimio**, por las facilidades brindadas, enseñanzas, paciencia y tolerancia, pero sobre todo por su inapreciable apoyo para la realización de este proyecto.

A la Clínica de Reproducción Asistida **HISPAREP**, biólogos, médicos y personal, por abrirme sus puertas y brindarme siempre lo necesario.

A mi amiga y compañera de trabajo **Laura Gaitan**, por todos los momentos vividos, risas, pláticas y consejos. Por fortuna, nuestra amistad no termina junto con este trabajo.

Al equipo del **laboratorio de Inmunobiología** del Hospital Juárez de México; Naye, Marina, Lore, Susy, Kike y Aldapa, por el trato tan amigable y sus asesorías para llevar a cabo esta tesis. Fue muy agradable trabajar con ustedes.

A **Avilene Rosas**, porque siempre has sido un ejemplo a seguir. A pesar de la distancia nuestra amistad es siempre fuerte. Incondicionalmente has estado cuando lo he necesitado.

A todos mis amigos de la facultad, que hicieron de mi carrera una experiencia inolvidable.

## A MIS SINODALES

<b>PRESIDENTE</b>	M. en B. E. ENRIQUE MENDIETA MÁRQUEZ
<b>VOCAL</b>	M. en C. PEDRO CUAPIO PADILLA
<b>SECRETARIO</b>	Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO
<b>SUPLENTE</b>	M en E. S. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ
<b>SUPLENTE</b>	Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

PORQUE CADA UNO DE SUS COMENTARIOS Y OBSERVACIONES AYUDARON A ENRIQUECER Y PERFECCIONAR ESTE PROYECTO Y MI FORMACIÓN PROFESIONAL.

**¡GRACIAS!**

### **A mis padres Ibar y Rosalía**

Cuando todo parecía derrumbarse, siempre fueron mi apoyo, mis consejeros. Gracias a ustedes soy lo que soy, a pesar de las dificultades han sabido ser padres ejemplares. Son mi sostén y mi motivación para seguir adelante y serán por siempre mi mayor admiración e inspiración.

### **A mis hermanos Daniel y Adrián**

Porque ni los malos momentos nos han separado y siempre han estado a mi lado, en mi corazón solo puede haber agradecimientos hacia ustedes.

### **A mi novia Brenda**

Siempre me aconsejaste y me mostraste el mejor camino a seguir. Gracias por ser mi guía. Por detenerme cuando debías y por empujarme cuando tenía miedo de seguir mis sueños. TE AMO. **\*\*Por siempre y para siempre\*\***

### **A mis sobrinos Ian y Diego**

Porque su presentación llenó de alegría nuestras vidas con su inocencia y curiosidad. Por ustedes me toca ser un ejemplo a seguir.

Índice .....	6
Índice de abreviaturas .....	8
Resumen .....	10
Introducción .....	11
Marco Teórico .....	13
I.    Aparato Reproductor Masculino .....	13
1.    Intersticio .....	16
2.    Túbulos seminíferos .....	18
3.    Células germinales .....	18
4.    Espermatogénesis .....	19
5.    Proliferación mitótica .....	20
6.    Meiosis .....	21
7.    Espermiogénesis .....	21
8.    Células de Sertoli .....	22
II.   Eje hipotálamo-hipófisis-testículo .....	23
III.  Semen .....	26
IV.  Infertilidad masculina .....	27
V.   Análisis seminal .....	30
VI.  Fragmentación de ADN espermático .....	32
1.  Técnicas de evaluación de fragmentación de ADN .....	37
a)  SCSA .....	38
b)  DBD-FISH .....	42
c)  SCD .....	43
d)  Cometa .....	43
e)  TUNEL .....	44
f)  ISNT .....	45
VII. Apoptosis .....	47
VIII. Criopreservación .....	52
1.  Agentes crioprotectores .....	55
a)  Agentes crioprotectores penetrantes .....	55
b)  Agentes crioprotectores no penetrantes .....	56
2.  Métodos de criopreservación .....	56
a)  Congelación de espermatozoides .....	57
IX.  Preservación de la fertilidad .....	59
1.  Banco de semen .....	61

Planteamiento del problema .....	63
Justificación .....	64
Hipótesis .....	65
Objetivos .....	66
Materiales y Métodos .....	67
Resultados .....	78
I. Análisis seminal .....	78
II. Fragmentación de ADN .....	81
III. Apoptosis .....	95
Discusión .....	105
Conclusiones .....	117
Bibliografía .....	118



<b>7-AAD:</b>	7-amino-actinomicina
<b>ABS:</b>	Análisis Básico de Semen
<b>ACP:</b>	Agentes Crioprotectores
<b>ADN:</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ANO:</b>	Azoospermia no obstructiva
<b>AO:</b>	Naranja de Acridina
<b>ART:</b>	Técnicas de Reproducción Asistida
<b>AT:</b>	Azul de Toluidina
<b>ATP:</b>	Adenosin Trifosfato
<b>AV:</b>	Anexina V
<b>CMA:</b>	Cromomicina A3
<b>DAPI:</b>	4,6 diamidino-2-phenylindole
<b>DBD-FISH:</b>	Detección de Rotura de ADN-Hibridación <i>In Situ</i> Fluorescente
<b>DFI:</b>	Índice de fragmentación de ADN
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT:</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EEJ:</b>	Electro-eyaculación
<b>ETE:</b>	Extracción Testicular de Espermatozoides
<b>FITC:</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FL1:</b>	Primera Fluorescencia
<b>FL2:</b>	Segunda Fluorescencia
<b>FL3:</b>	Tercera Fluorescencia
<b>FSH:</b>	Hormona Folículo Estimulante
<b>FSC:</b>	Forward Scatter
<b>GnRH:</b>	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
<b>hCG:</b>	Gonadotropina Coriónica humana
<b>hMG:</b>	Gonadotropina Menopáusica humana
<b>HTF:</b>	Fluido Tubárico Humano
<b>IICE:</b>	Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides
<b>IMC:</b>	índice de Masa Corporal
<b>IP:</b>	Ioduro de Propidio

<b>ISNT:</b>	Desplazamiento de la rotura <i>in situ</i>
<b>LH:</b>	Hormona Luteinizante
<b>LRI:</b>	Límite de Referencia Interior
<b>MMP:</b>	Potencial de Membrana Mitocondrial
<b>NL<sub>2</sub>:</b>	Nitrógeno Líquido
<b>OAT:</b>	Oligoastenoteratospermia
<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PE:</b>	Ficoeritrina
<b>pH:</b>	Potencial Hidrógeno
<b>PROH:</b>	Propanediol
<b>PS:</b>	Fosfatidilserina
<b>PVS:</b>	Estimulación vibratoria del pene
<b>ROS:</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>SCD:</b>	Dispersión de la Cromatina Espermática
<b>SCSA:</b>	Ensayo de Estructura de la Cromatina Espermática
<b>SSC:</b>	Side Scatter
<b>SYBR:</b>	Synergy Brand
<b>TESE:</b>	Aspiración de espermatozoides testiculares
<b>TUNEL:</b>	Marcación de extremos rotos de ADN por transferasa terminal y dUTP

En la actualidad entre el 15 y 20% de parejas presentan problemas de fertilidad, de los cuales el 50% de los casos se atribuye al factor masculino. Se ha informado en años recientes que la calidad espermática es afectada por factores de diversa naturaleza entre ellos la edad, genética, endócrina, nutricional, ambiental, trastornos genitourinarios e infecciosos. Por esto, recurren a tratamientos de reproducción asistida donde se ofrecen medidas alternativas como el uso de semen de donantes de banco, el cual es sometido a procesos de criopreservación. El presente estudio se centró en evaluar la calidad seminal de muestras de pacientes con problemas de fertilidad y donantes de banco de semen, las cuales fueron criopreservadas por técnica convencional y rápida, además, el índice de fragmentación espermático y el grado de apoptosis. El seminograma mostró que el proceso de criopreservación disminuye los parámetros de concentración, movilidad, viabilidad y formas normales en comparación con los datos obtenidos en la evaluación en fresco. Sin embargo, la criopreservación rápida logró porcentajes más altos en las determinaciones realizadas que los medidos en la criopreservación convencional. De igual manera, se observó mejor calidad en muestras de donantes, posteriores al proceso de congelación en comparación con las muestras de pacientes infértiles. El índice de fragmentación espermático (DFI) se evaluó por los métodos SCSA y SCD. Se comprobó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre estos métodos de evaluación de DFI por lo que se pueden utilizar indistintamente. Se obtuvo que las muestras criopreservadas por técnica convencional sufren mayor afectación al ADN, mientras que las criopreservadas por técnica rápida mostraron mejor potencial fertilizante. Este efecto se observó tanto en muestras de donantes como en pacientes. El estudio de apoptosis reveló porcentajes más altos de viabilidad, bajos porcentajes de apoptosis y necrosis en donantes cuando se congeló por técnica rápida, el mismo patrón se observó en pacientes. En base a los resultados obtenidos, se concluye que la congelación rápida resulta más favorable para su utilización en clínicas de reproducción asistida y se recomienda la incorporación de la evaluación del DFI en el análisis seminal convencional.

El proceso reproductivo es un acontecimiento muy complejo que representa para cada individuo la posibilidad de perpetuar su especie a través de sus descendientes. La reproducción es el evento mediante el cual se generan nuevos seres vivos a partir de los organismos ya existentes. Por ello, es para el hombre como para el resto de organismos vivos una necesidad (Velázquez, 2009).

La reproducción depende de la unión de los gametos femeninos y masculinos (células reproductivas o germinales), que contienen un solo juego de cromosomas (haploides), para formar un nuevo individuo con un número doble de cromosomas (diploides). Los sistemas reproductivos masculino y femenino están diseñados para permitir la unión del material genético de los dos compañeros sexuales (Sherwood, 2011).

Los órganos reproductores primarios o gónadas, consisten en un par de testículos en el hombre y un par de ovarios en las mujeres. En ambos sexos, las gónadas maduras realizan una doble función: producir gametos (gametogénesis), es decir, espermatozoides y óvulos respectivamente, así como secretar hormonas sexuales. Los espermatozoides son producidos por los túbulos seminíferos, transportados por un sistema de conductos desde el testículo al exterior para el proceso de fertilización. En condiciones normales, los individuos de ambos sexos secretan tanto estrógenos como andrógenos. Los andrógenos son los esteroides predominantes en el macho cuya función principal es estimular el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos, son producidos en las células intersticiales de Leydig. Los estrógenos son las hormonas predominantes en la hembra, son responsables de características sexuales femeninas. Se sintetizan en las células de la granulosa (Sherwood, 2011; Ganong, 2006; Tresguerres, 2005).

Además de las gónadas, el sistema reproductivo en cada sexo incluye un tracto reproductivo que abarca un sistema de conductos especializados para transportar o albergar los gametos después de que se producen, así como glándulas sexuales accesorias que vacían sus secreciones en estos conductos (Sherwood, 2011).

El proceso reproductivo requiere la participación del gameto femenino que procede del evento de maduración folicular efectuado en el ovario, además de la participación de estructuras del sistema nervioso central, que constituyen el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Por su parte, el semen depositado en el fondo de saco vaginal y en el conducto endocervical durante el coito, contiene como elemento principal al gameto masculino, que se forma y madura en el testículo, también en colaboración con el sistema nervioso central constituyendo así el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Velázquez, 2009).

Las funciones secretoras y gametogénicas de las gónadas dependen de la secreción de las gonadotropinas de la hipófisis anterior, la hormona foliculostimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Ganong, 2006).

## Aparato Reproductor masculino

El aparato reproductor masculino (Figura 1) está compuesto por los testículos o gónadas masculinas, un sistema de conductos que incluyen las vesículas seminales y glándulas sexuales accesorias como la próstata y estructuras de soporte, como son el escroto y el pene (Tresguerres, 2005).

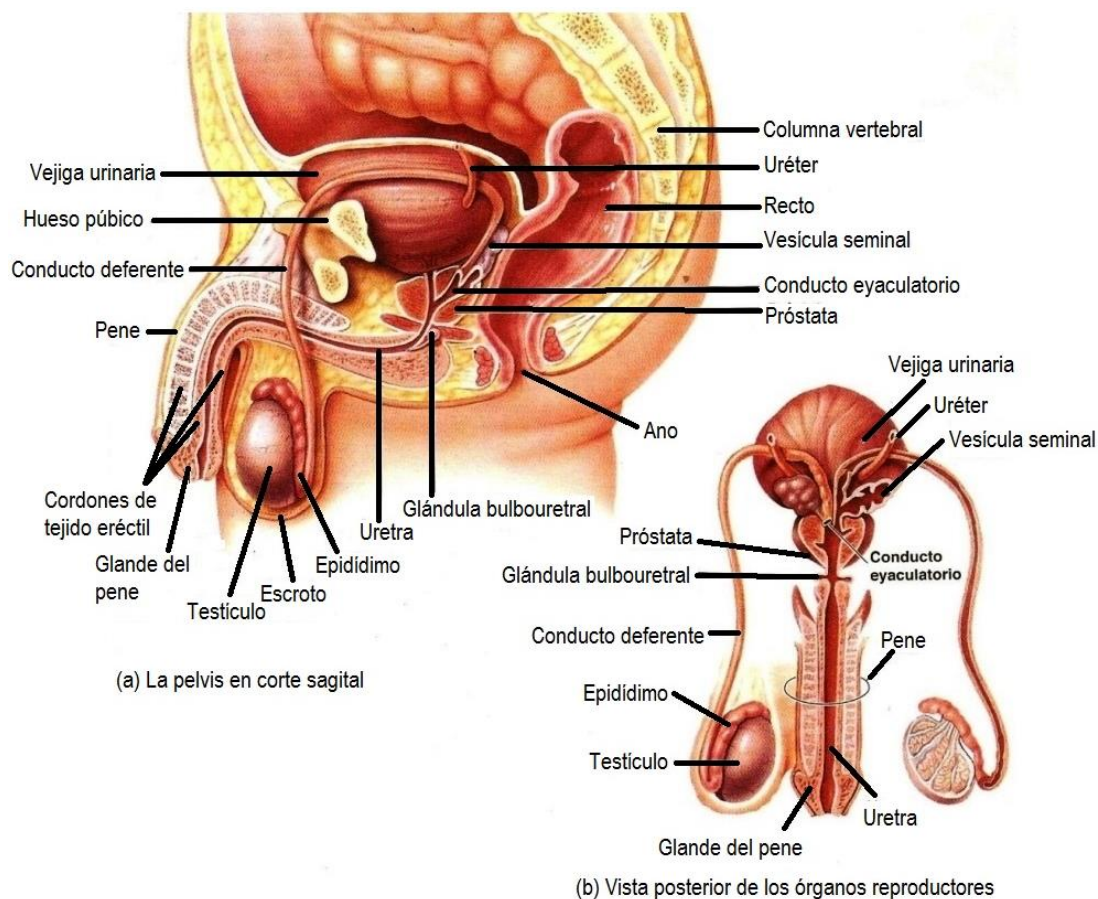
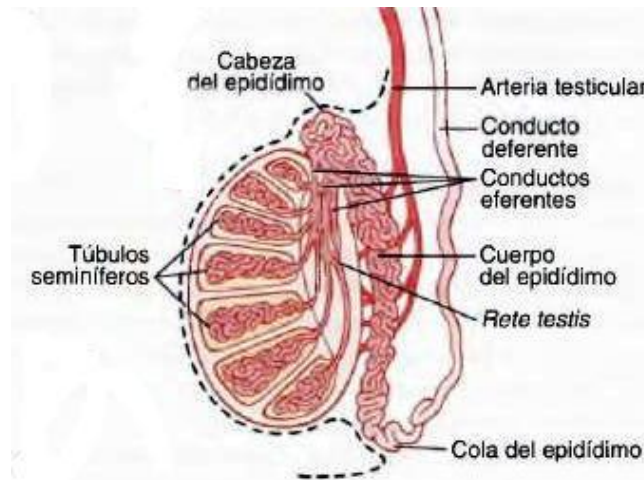


Figura 1. Sistema reproductivo masculino (Tomada de Sherwood, 2011)

Los testículos (Figura 2) están suspendidos fuera de la cavidad abdominal en un saco cubierto de piel, el escroto, que yace entre el ángulo de las piernas. Son un par de estructuras ovoides con un diámetro alrededor de 5 cm y un peso aproximado a 15 g (Sherwood, 2011; Guyton *et al*, 2011; Tresguerres, 2005). Se desarrollan a partir de estructuras cercanas a los riñones, localizadas por lo tanto en la pared abdominal

posterior. Al final de la etapa fetal, descienden a través del conducto inguinal para alojarse en las bolsas (Tresguerres, 2005).



**Figura 2. Estructura interna del testículo y su relación con el epidídimo (Tomada de Guyton *et al*, 2011).**

Contienen hasta 900 túbulos muy retorcidos denominados túbulos seminíferos en los que se forman los espermatozoides. Estos túbulos se continúan a través de los conductos eferentes y la denominada red testicular (*rete testis*) con el epidídimo, otro tubo espiral de unos 6 m de longitud localizado a lo largo del borde posterior testicular que tiene tres porciones; la cabeza, donde los conductos eferentes se unen al epidídimo, el cuerpo o porción central y la cola, porción inferior que desemboca en el conducto deferente. Este tiene alrededor de 45 cm de longitud y asciende por el conducto inguinal hasta la cavidad pélvica, donde rodea la vejiga urinaria y termina en las ampollas que se continúan con los conductos eyaculadores que desembocan en la uretra a través de la próstata (Guyton *et al*, 2011; Tresguerres, 2005).

La uretra es el eslabón final de la comunicación del testículo con el exterior, por lo tanto es el conducto terminal de los sistemas reproductor y excretor, que sirve de paso tanto al semen como a la orina. Mide alrededor de 20 cm y se divide en tres partes: la uretra prostática, de 2 a 3 cm de longitud, que atraviesa la próstata; la uretra membranosa, de 1 cm, que atraviesa el diafragma urogenital y la uretra peneana, que pasa entre los cuerpos

cavernosos del pene, tiene una longitud de 15 cm y termina en el orificio uretral externo (Tresguerres, 2005).

El sistema reproductivo masculino está diseñado para entregar espermatozoides al tracto reproductivo femenino en un vehículo líquido, el semen, que es propicio para la viabilidad de los espermatozoides. Las principales glándulas sexuales accesorias masculinas, cuyas secreciones proveen el grueso del líquido seminal son las vesículas seminales, próstata y las glándulas bulbouretrales (Sherwood, 2011).

Las vesículas seminales son estructuras bolsiformes muy acodadas, localizadas en la base de la vejiga urinaria, que desembocan en los conductos eyaculadores. Su secreción está formada por un líquido viscoso alcalino, que contiene fructosa, prostaglandinas y fibrinógeno. La alcalinidad de la secreción prostática ayuda a neutralizar la acidez del tracto genital femenino, que inactivaría a los espermatozoides. La fructosa sirve como elemento energético para los espermatozoides y las prostaglandinas contribuyen a su viabilidad y motilidad. El fibrinógeno permite la coagulación del semen tras la eyaculación (Tresguerres, 2005).

La próstata es una glándula localizada por debajo de la vejiga urinaria, rodeando la primera porción uretral, que secreta hacia ésta un líquido lechoso que contiene ácido cítrico y enzimas que contribuyen a la coagulación seminal. Este líquido supone cerca del 25 % del semen y ayuda a la viabilidad espermática (Tresguerres, 2005).

Las glándulas de Cowper o glándulas bulbouretrales están localizadas a ambos lados de la uretra membranosa, tienen el tamaño de guisantes y secretan una sustancia lubricante alcalina que protege a los espermatozoides. También lubrican el glande peneano durante las relaciones sexuales (Tresguerres, 2005).

El pene es un órgano cilíndrico, que sirve para depositar el semen en la vagina. Está formado por tres masas cilíndricas unidas por un tejido fibroso denominado túnica albugínea. Las tres masas están rodeadas por fascia y piel y consisten fundamentalmente en tejido erectil más o menos rellenos de grandes lagos sanguíneos. Mediante el estímulo



sexual aumenta el aporte sanguíneo arterial al pene, que al dilatarse comprime las venas que lo drenan; la sangre queda atrapada y se produce la erección. Cuando finaliza el estímulo, las arterias se cierran hasta cesar el aporte sanguíneo y las venas vuelven a trabajar normalmente, con lo que el pene recupera la flacidez de reposo (Tresguerres, 2005).

### Intersticio

- **Células de Leydig**

Los testículos realizan la función dual de producir espermatozoides y secretar testosterona. Cerca del 80 % de la masa testicular consiste en **túbulos seminíferos** altamente enrollados, dentro de los cuales se lleva a cabo la espermatogénesis. Las células endócrinas que producen andrógenos, las **células de Leydig** o **células intersticiales**, se encuentran en el tejido conjuntivo (tejido intersticial) entre los túbulos seminíferos (Figura 3). Por lo tanto, las porciones de los testículos que producen espermatozoides y secretan testosterona principalmente (también estradiol en pequeñas cantidades) son estructural y funcionalmente distintas (Sherwood, 2011; Tresguerres, 2005).

La testosterona es una hormona esteroidea derivada del colesterol como lo son las hormonas sexuales femeninas, el estrógeno y la progesterona (Figura 4). Una vez producida, parte de la testosterona es secretada en la sangre, donde es transportada, unida a proteínas plasmáticas, a sus blancos de acción. Una porción significativa de la testosterona recién sintetizada va hacia el lumen de los túbulos seminíferos, donde juega un papel importante en la producción de espermatozoides (Sherwood, 2011).

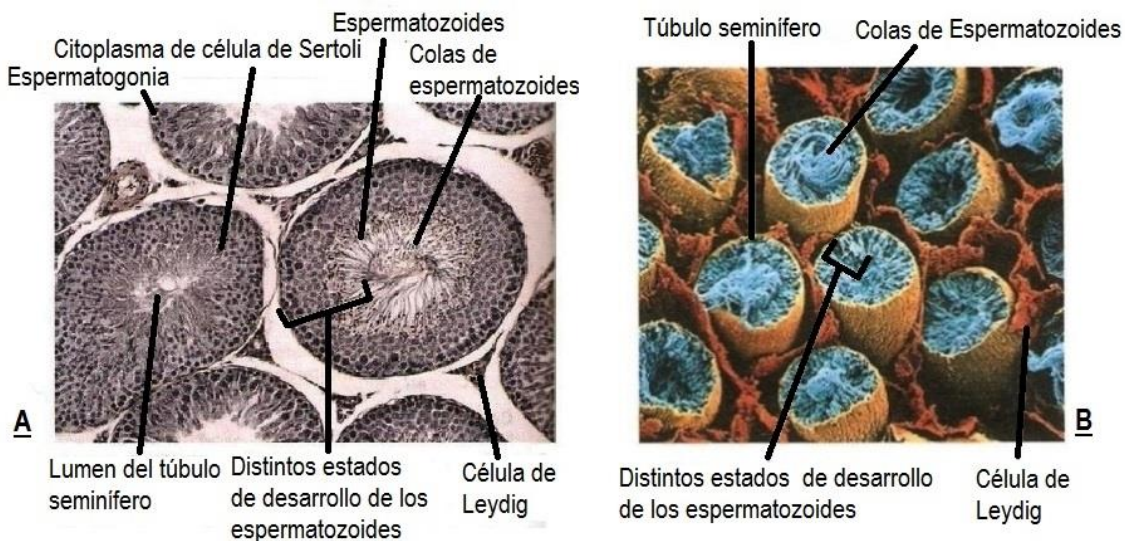


Figura 3. Fotomicrografías del tejido intersticial y túbulos seminíferos. (Tomada de Sherwood, 2011).

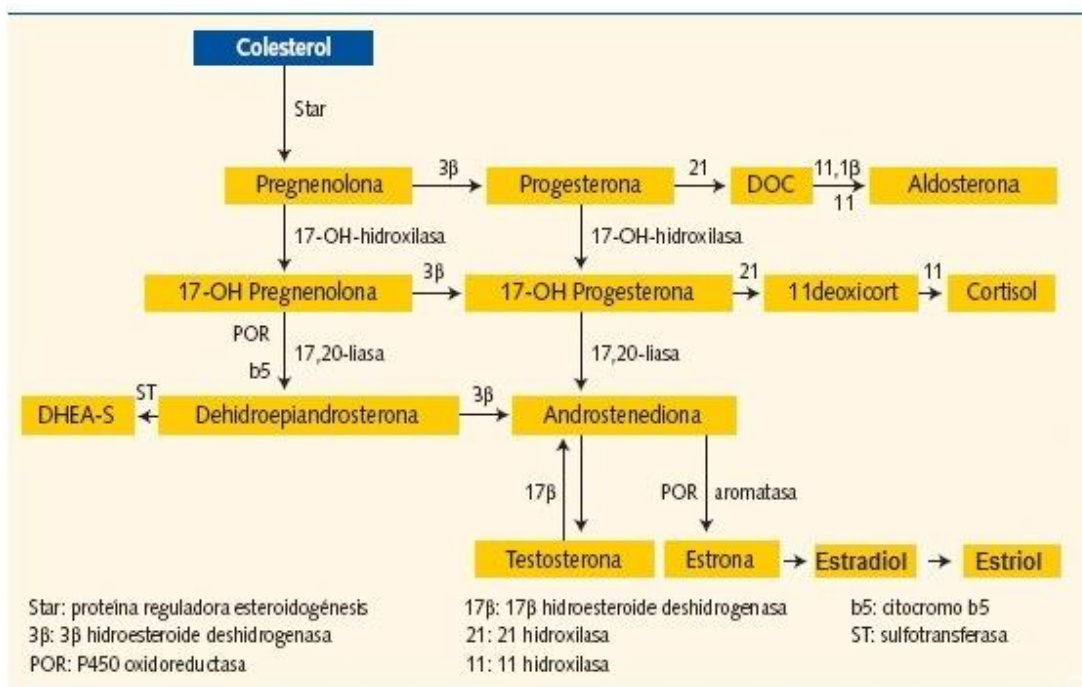


Figura 4. Vías esteroidogénicas para las principales hormonas esteroides. (Tomada y modificada de García, 2009)

Para ejercer sus efectos, la testosterona (y otros andrógenos) se unen con los receptores para andrógenos en el citoplasma de las células blanco. El complejo andrógeno-receptor se mueve al núcleo, donde se une con el elemento de respuesta a andrógenos en el ADN, lo que conlleva a la transcripción de genes que dirigen la síntesis de nuevas proteínas que

llevan a cabo la respuesta celular deseada. Gran parte de las acciones de la testosterona funcionan para asegurar la entrega de espermatozoides a la hembra (Sherwood, 2011).

### Túbulos seminíferos

Cerca de 250 m de túbulos seminíferos productores de espermatozoides están empacados en los testículos (Figura 5) (Sherwood, 2011). Los túbulos seminíferos presentan un epitelio con cuatro a ocho filas de células redondeadas con una luz central. La base de las más periféricas descansa sobre una membrana basal y un armazón fibroso celular que sostiene el epitelio germinal que se denomina membrana limitante. Las células que comprende el epitelio poliestratificado son de dos clases: *células germinales*, cuya mayoría se encuentra en diferentes fases de la meiosis, y las *células de Sertoli*, que proveen el apoyo crucial para la espermatogénesis (Sherwood, 2011; Tresguerres, 2005).

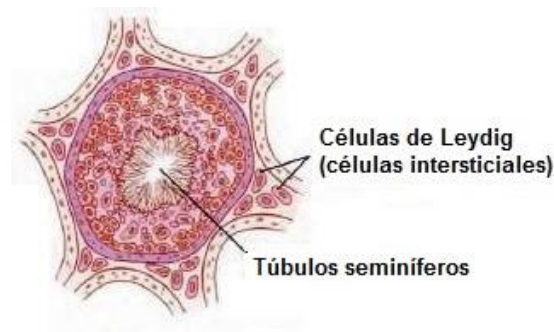


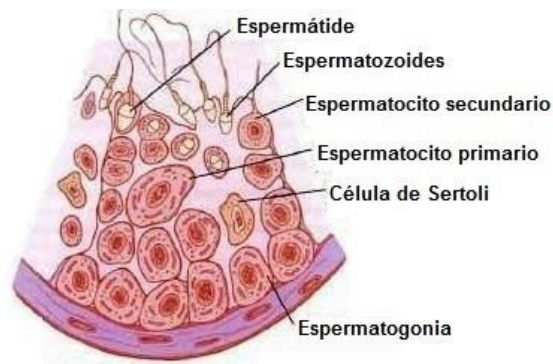
Figura 5. Corte transversal en un túbulo seminífero. (Tomada de Guyton *et al*, 2011).

#### A. Células germinales

Constituyen la mayor parte del túbulo seminífero y se distribuyen de forma ordenada desde la membrana basal a la luz tubular, de menos a más diferenciadas. Las que descansan sobre la membrana son de tres tipos según sus propiedades tioriales: A oscuras, A claras y B, que se encuentran en distinto estadio madurativo. Las espermatogonias tienen pequeño tamaño, son redondeadas y aparentemente tienen una profase más larga que otras células (Tresguerres, 2005).

### Espermatogénesis

Durante la formación del embrión, las células germinales primordiales emigran hacia los testículos y se convierten en células germinales inmaduras llamadas espermatogonias, que ocupan las dos o tres capas más internas de los túbulos seminíferos (Figura 6). las espermatogonias comienzan a dividirse por mitosis a partir de la pubertad y continúan proliferando y diferenciándose a los estadios definitivos de desarrollo para formar espermatozoides (Guyton *et al*, 2011).



**Figura 6. Fases del desarrollo de los espermatozoides a partir de las espermatogonias. (Tomada de Guyton *et al*, 2011).**

A la espermatogénesis le toma  $74 \pm 5$  días desarrollar una espermatogonia en un espermatozoide maduro. El proceso abarca tres estados principales: *Proliferación mitótica*, *meiosis* y *empaquetamiento* (Figura 7) (Sherwood, 2011; Tresguerres, 2005).

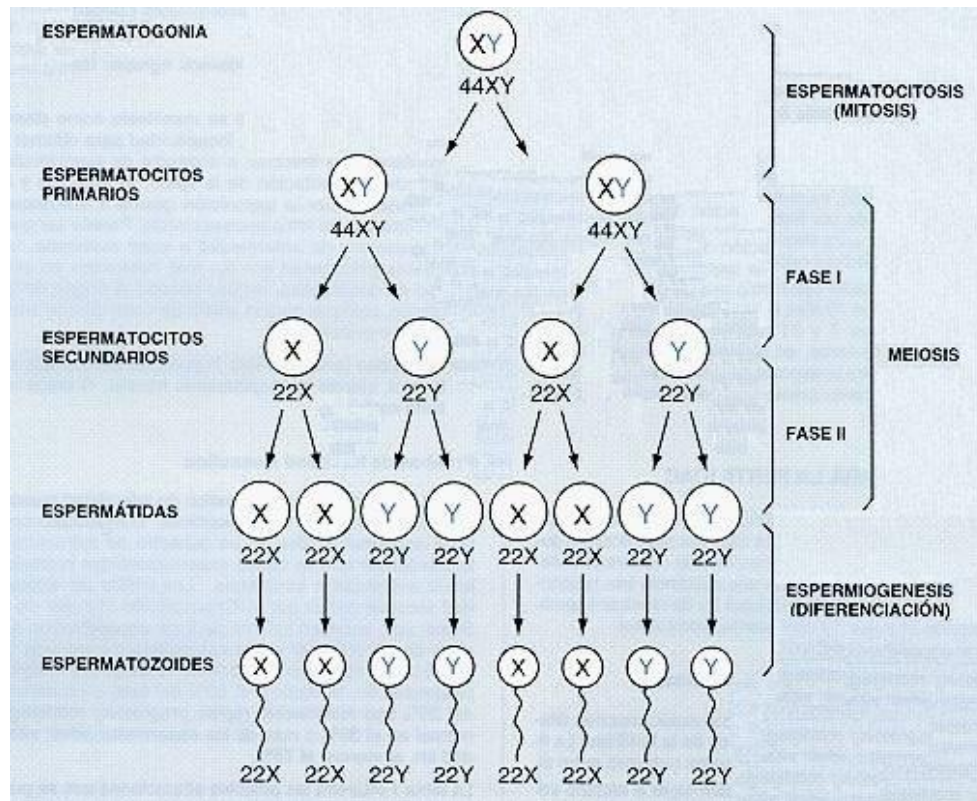


Figura 7. Espermatogénesis (Tomada de Stuth, 2007).

### I. Proliferación mitótica

Las espermatogonias más próximas a la membrana del túbulo se dividen mitóticamente de forma continua, y todas las células nuevas llevan un juego completo de 46 cromosomas idénticos a los de la célula parental. Esta proliferación provee un suministro continuo de nuevas células germinales. Después de la división mitótica de la espermatogonia, una de las células hijas permanece en el borde del túbulo como una espermatogonia indiferenciada manteniendo la línea de células germinales. Las otras células hijas comienzan a moverse hacia el lumen, mientras sufren los varios pasos requeridos para formar espermatozoides, que posteriormente serán liberados hacia ésta. Las células hijas formadoras de espermatozoides se dividen dos veces para formar cuatro **espermatocitos primarios**. Después de la última división mitótica, los espermatocitos primarios entran a una fase de reposo durante la cual se duplican los cromosomas y las cromátidas dobles permanecen juntas para la preparación de la primera división meiótica (Sherwood, 2011).



### II. Meiosis

Durante la meiosis, cada espermatocito primario (con un número diploide de 46 cromosomas dobles) forman dos **espermatocitos secundarios** (cada uno con un número haploide de 23 cromosomas dobles) durante la primera división meiótica, creando cuatro **espermátides** (cada una con 23 cromosomas sencillos) como resultado de la segunda división meiótica (Sherwood, 2011).

Después de este estado de la espermatogénesis ya no se llevan a cabo más divisiones. Cada espermátide es remodelada en un solo espermatozoide. Debido a que cada espermatogonia produce mitóticamente cuatro espermatocitos primarios, y cada espermatocito primario da lugar meióticamente a cuatro espermátides, la secuencia espermatogénica puede producir teóricamente 16 espermatozoides cada vez que una espermatogonia inicia este proceso. Sin embargo, usualmente, algunas células se pierden en varios estados, por lo que esta eficiencia de productividad es raramente tan alta (Sherwood, 2011).

### III. Empaquetamiento (espermioagénesis)

Aún después de la meiosis, las espermátides siguen pareciéndose estructuralmente a las espermatogonias indiferenciadas, excepto por que tienen la mitad del complemento de sus cromosomas. La producción de sus espermatozoides móviles altamente especializados a partir de las espermátides requiere un remodelamiento excesivo, o **empaquetamiento** de los elementos celulares, un proceso alternativo conocido como **espermioagénesis**. En los espermatozoides son removidos gran parte del citosol y cualquier organelo no necesario para entregar la información genética del espermatozoide a un óvulo. Por lo tanto, el espermatozoide viaja ligero, llevándolo consigo solo los componentes esenciales para lograr la fertilización (Sherwood, 2011).

Un espermatozoide consta de tres partes (Figura 8): Una cabeza cubierta con un acrosoma, una pieza media y una cola. La **cabeza** consiste principalmente en el núcleo, que contiene el complemento de información genética del espermatozoide. El **acrosoma**,

una vesícula repleta de enzimas que cubre la punta de la cabeza, las cuales son necesarias para penetrar el óvulo, es un lisosoma modificado, se forma por la agregación de vesículas producidas por el complejo retículo endoplasmático/Golgi antes de que estos organelos sean descartados. Las enzimas acrosomales permanecen inactivas hasta que el espermatozoide tiene contacto con el óvulo, punto en el cual son liberadas. La movilidad del espermatozoide está provista por una larga **cola** tipo látigo (un flagelo), cuyo movimiento es generado por las mitocondrias concentradas en la **pieza media** de éste (Sherwood, 2011).

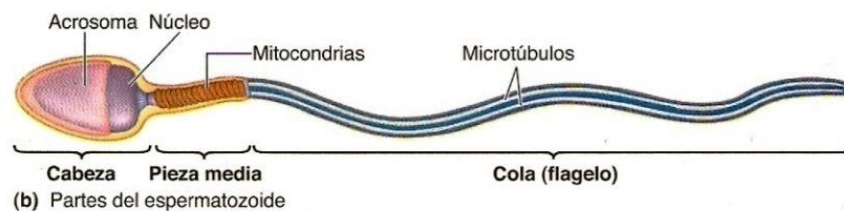


Figura 8. Anatomía de un espermatozoide (Tomada de Sherwood, 2011).

### B. Células de Sertoli

Son grandes, se extienden radialmente desde la membrana basal en dirección a la luz tubular y hasta hace poco tiempo, se suponía que su función era únicamente de sostén de las células germinales. En los últimos años ha cobrado interés por su participación en el transporte de sustancias dentro del túbulo seminífero, en el metabolismo de las células germinales, en el control de la espermatogénesis y en la producción de sustancias que controlan los niveles de hormona foliculoestimulante (FSH) (Tresguerres, 2005).

Las uniones estrechas entre las células de Sertoli adyacentes cercanas a la lámina basal forman una **barrera hematotesticular** que impide que muchas moléculas grandes pasen del tejido intersticial y la parte del túbulo cerca de la lámina basal (compartimiento basal) a la región cercana a la luz tubular (compartimiento adluminal) y la luz. Sin embargo, los esteroides penetran esta barrera con facilidad y se tiene evidencia de que algunas proteínas pasan de las células de Sertoli a las de Leydig y viceversa en forma parácrina.

Además las células germinales en maduración deben pasar por la barrera cuando se mueven hacia la luz (Ganong, 2006).

### Eje hipotálamo-hipófisis-testículo

Una parte importante del control de las funciones sexuales, comienza con la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, gonadotropin-releasing hormone) en la adenohipófisis por el hipotálamo (Figura 9). Esta hormona, a su vez, estimula la secreción de otras dos hormonas denominadas gonadotropinas: la LH y la FSH. A su vez, la LH es el estímulo primario para la secreción de testosterona por los testículos; la FSH estimula principalmente la espermatogénesis (Guyton *et al*, 2011).

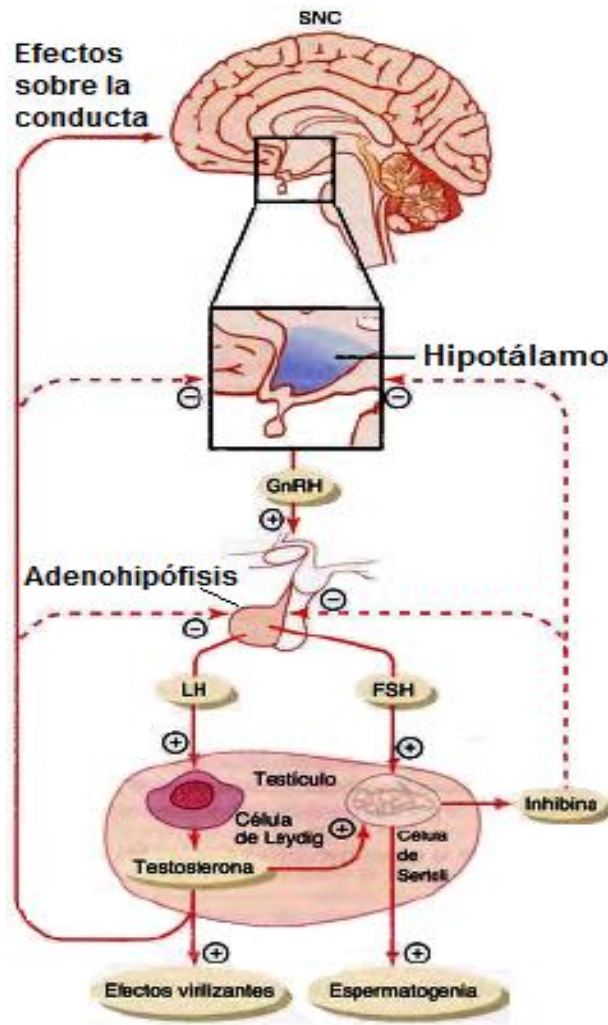


Figura 9. Regulación del eje hipotalámico-hipofisario-testicular (Tomada de Guyton *et al*, 2011).



La GnRH es un péptido de 10 aminoácidos secretado por neuronas cuyos cuerpos celulares se encuentran en el núcleo infundibular (arqueado) del hipotálamo. Las terminaciones de estas neuronas acaban principalmente en la eminencia media del hipotálamo, donde liberan GnRH al sistema vascular portal hipotálamo-hipofisario. En la adenohipófisis la GnRH estimula la síntesis y la liberación de FSH y LH. La secreción de GnRH es intermitente, produciéndose durante unos minutos cada 1 a 3 h. La intensidad de este estímulo hormonal depende de dos factores: 1) la frecuencia de los ciclos de secreción, y 2) la cantidad de GnRH liberada en cada ciclo (Guyton *et al*, 2011).

La secreción de LH por la adenohipófisis es también cíclica y sigue de forma bastante fiel la secreción pulsátil de GnRH. Por el contrario, la secreción de FSH sólo aumenta y disminuye ligeramente con las fluctuaciones de la GnRH; sin embargo, varía de una forma más lenta a lo largo de períodos de muchas horas en respuesta a las variaciones a largo plazo de la GnRH (Guyton *et al*, 2011).

La LH ejerce su efecto sobre las células de Leydig, mientras que la FSH sobre las células de Sertoli en los testículos, mediante la activación del sistema del segundo mensajero del monofosfato de adenosina cíclico, que a su vez activa a los sistemas enzimáticos específicos en las células correspondientes (Guyton *et al*, 2011).

Las células intersticiales de Leydig de los testículos secretan testosterona sólo cuando son estimuladas por la LH adenohipofisaria. Además, la cantidad de secreción de testosterona aumenta en proporción casi directa con la cantidad de LH disponible (Guyton *et al*, 2011).

La testosterona secretada por los testículos en respuesta a la LH tiene el efecto recíproco de inhibir la secreción hipofisaria de LH (Figura 9). Es probable que la mayor parte de esta inhibición sea consecuencia de un efecto directo de la testosterona sobre el hipotálamo, con inhibición de la secreción de GnRH. Esto, a su vez, reduce la secreción de LH y de FSH por la adenohipófisis y la disminución de la LH inhibe la secreción de testosterona por los testículos. Por tanto, cuando la secreción de testosterona es excesiva, este efecto automático de retroalimentación negativa, que opera a través del hipotálamo y la

adenohipófisis, hace que disminuya su producción de nuevo hasta un valor funcional normal. A la inversa, una cantidad demasiado escasa de testosterona permite que el hipotálamo secrete gran cantidad de GnRH, con el correspondiente ascenso de la secreción adenohipofisaria de LH y FSH y el incremento de la producción testicular de testosterona (Guyton *et al*, 2011).

En los túbulos seminíferos la FSH se une a receptores específicos situados en la superficie de las células de Sertoli de los túbulos seminíferos, lo que hace que estas células crezcan y secreten varias sustancias espermatógenas. Al mismo tiempo, la testosterona (y la dihidrotestosterona) que difunde al interior de los túbulos desde las células de Leydig de los espacios intersticiales también ejerce un efecto estimulante de la espermatogonía. Por tanto, para que esta tenga lugar son necesarias tanto la FSH como la testosterona (Guyton *et al*, 2011).

### Semen

El líquido eyaculado al momento del orgasmo es el semen; éste contiene espermatozoides y secreciones de las vesículas seminales, la próstata, las glándulas de Cowper y de las glándulas uretrales (Tabla 1) (Barret *et al*, 2013).

<b>Color</b>	<b>Blanco, opalescente</b>
<b>Densidad</b>	1.028
<b>Recuento espermático</b>	Promedio 39 millones/ml, con 4% de formas normales.
<b>Otros componentes</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fructosa ( 1.5-6.5 mg /ml)</li> </ul>	<b>Desde las vesículas seminales (contribuye con el 60% del volumen total)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosforilcolina</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ergotioneína</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido ascórbico</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavinas</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prostaglandinas</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espermina</li> </ul>	<b>Desde la próstata (contribuye con 20% del volumen total)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido cítrico</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colesterol, fosfolípidos</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibrinolisisina, fibrinogenasa</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zinc</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfatasa ácida</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfato</li> </ul>	<b>Amortiguadores</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bicarbonato</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hialuronidasa</li> </ul>	

**Tabla 1. Componentes del semen humano (Tomado y modificado de Barret *et al*, 2013)**

El volumen promedio por eyaculación es de 1.5 ml después de algunos días (3 ó 4) de abstinencia de actividad sexual. El volumen del semen y el recuento espermático se reducen de manera rápida luego de varias eyaculaciones. Aunque sólo se necesita un espermatozoide para fertilizar el óvulo, cada mililitro de semen tiene alrededor de 39 millones de espermatozoides. La disminución en la producción de espermatozoides se acompaña de infertilidad, la mitad de los varones que tienen menos de 20 millones/ml

son infértiles. La presencia de muchos espermatozoides con alteraciones morfológicas o inmóviles también se correlaciona con infertilidad. Las prostaglandinas del semen, que provienen en realidad de las vesículas seminales, son abundantes pero esta función en el semen no se conoce (Barret *et al*, 2013; Sarabia *et al*, 2011).

Los espermatozoides del ser humano se desplazan a una velocidad de 3mm/min a través del aparato reproductor femenino y llegan a las trompas uterinas de 30 a 60 minutos después del coito. Las contracciones de los órganos femeninos facilitan el transporte de éstos hasta dichas trompas (Barret *et al*, 2013).

### **Infertilidad Masculina**

La infertilidad es la incapacidad de una pareja sexualmente activa para lograr el embarazo en un año. En el varón se puede evaluar la infertilidad o subfertilidad usando una variedad de intervenciones clínicas, y también a partir de una evaluación de laboratorio del semen (OMS, 2010).

El diagnóstico de la infertilidad masculina se basa principalmente en el análisis de semen de rutina, una evaluación microscópica de parámetros del semen, incluyendo recuento, viabilidad, movilidad y morfología de los espermatozoides en el eyaculado. El análisis de rutina del semen tiene un poder limitado cuando se solicita la diferenciación entre hombres fértiles e infértiles (Muratori *et al*, 2010).

En la actualidad entre el 15 y 20% de las parejas en edad reproductiva tiene problemas de infertilidad, de ahí que el factor masculino se relacione con la mitad de los casos de parejas infértiles (Góngora *et al*, 2011; Góngora *et al*, 2010; Dohle *et al*, 2010; Rafaela, 2007; Cortés *et al*, 2007).

Las causas del incremento en la prevalencia de la infertilidad masculina son difíciles de establecer. Este aumento podría deberse por lo menos a cuatro factores: postergación del momento en que se decide tener hijos, alteraciones en la calidad del semen, cambios en la conducta sexual y eliminación de la mayoría de los tabúes (Brugo *et al*, 2003). La edad

en el caso de la mujer es un punto importante. Se ha demostrado que el índice de fertilidad humana en la mujer es máximo alrededor de los 25 años y disminuye de forma importante a los 35, y se considera que a los 40 años la tasa de infertilidad estaría entre el 65-70% (Rafaela, 2007).

Una de las causas potenciales de infertilidad masculina es la infección asintomática y sintomática del tracto urogenital (Núñez *et al*, 2007). Así mismo, la fertilidad masculina puede verse reducida como consecuencia de anomalías genitourinarias congénitas o adquiridas, infecciones de las vías genitourinarias, aumento de la temperatura escrotal (por ejemplo, como consecuencia de un varicocele), trastornos endocrinos, anomalías genéticas y factores inmunitarios (Dohle, *et al*, 2010). Por otra parte, hay estudios que muestran una disminución en la calidad del semen, que puede deberse a factores ambientales como la temperatura, las radiaciones, los fármacos, el estrés, los estimulantes (drogas, alcohol, tabaco) o las deficiencias nutricionales (selenio, zinc, vitaminas) (Rafaela, 2007). La obesidad está siendo considerada como un factor masculino de infertilidad, y los datos reportados hasta ahora son a favor de una posible asociación entre las anomalías en el peso corporal y de los parámetros del semen, aunque hay informes contradictorios. Varios parámetros convencionales del semen (volumen de semen, concentración espermática, el recuento total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides móviles y porcentaje de espermatozoides con morfología normal) han sido más bajos en pacientes obesos. A pesar de esta evidencia, hay que destacar que muchos hombres con sobrepeso y obesidad tienen parámetros seminales convencionales normales (La Vignera *et al*, 2012).

La infertilidad afecta aproximadamente al 15% de los mexicanos. Se presentan tanto en hombres como en mujeres, en el hombre (30%), en la mujer (30%) o en ambos (40%) y en algunos casos, la causa puede llegar a ser inexplicable. El 30% por causas masculinas se atribuye a alteraciones en el ámbito testicular, obstrucción de conductos, patologías en la próstata, alteraciones en la eyaculación o erección y alteraciones en el semen (IVI, 2013).

En la tabla 2 se resumen los principales factores asociados a infertilidad masculina.

Infertilidad masculina idiopática	31 %
Criptorquidia	7.8 %
Infección genitourinaria	8.0 %
Trastornos del depósito del semen y factores sexuales	5.9 %
Enfermedades generales y sistémicas	3.1 %
Varicocele	15.6 %
Hipogonadismo	8.9 %
Factores inmunitarios	4.5 %
Obstrucciones	1.7 %
Otras anomalías	5.5 %

**Tabla 2. Factores asociados a infertilidad masculina y porcentaje de distribución (Tomada de Dohle *et al*, 2010).**

Aunque los factores de infertilidad masculina con disminución de la calidad del semen contribuyen alrededor de la mitad de toda la falta involuntaria de hijos, el valor de los parámetros seminales normales en la predicción de la fertilidad *in vivo* y la elección del método adecuado para la reproducción asistida es limitado (Bungum, 2012).

En el 30% - 40% de los casos no se identifica ningún factor asociado a infertilidad masculina (infertilidad masculina idiopática). Estos varones consultan sin antecedentes de problemas de fertilidad y tienen unos resultados normales en la exploración física y las pruebas analíticas endocrinológicas. El espermiograma, sin embargo, revela una disminución del número de espermatozoides (oligozoospermia), una reducción de la motilidad de los espermatozoides (astenozoospermia) y muchas formas anormales de espermatozoides (teratozoospermia); estas anomalías suelen aparecer juntas y se denominan síndrome de oligoastenoteratospermia (OAT) (Dohle *et al*, 2010).

En la actualidad los parámetros obtenidos a través de un seminograma convencional no aportan una información completa sobre el potencial fecundante del semen y la capacidad de dar lugar a un embrión sano y un embarazo evolutivo. Un estudio exhaustivo del factor masculino requiere determinar algún otro parámetro como es la fragmentación del ADN espermático (Morales, 2007).

### Análisis seminal

En los últimos años, en Latinoamérica así como en el resto del mundo, las consultas por infertilidad han experimentado un incremento notable. El análisis seminal continúa siendo la herramienta básica de rutina que brinda la mejor información para evaluar la calidad reproductiva del varón. Este examen permite estimar la severidad del factor masculino en la infertilidad y establecer las posibles estrategias terapéuticas para la pareja (Franken *et al*, 2012; Sarabia *et al*, 2011).

El análisis del semen no tiene valor predictivo absoluto de fertilidad, pero informa sobre el potencial de fertilidad del varón, el cual está relacionado con la calidad de sus espermatozoides y de otras variables del semen (Cruz *et al*, 2010).

Sin embargo, el contexto en el que una muestra de semen se obtiene también es importante, que se ejemplifica por los resultados que producen eyacular durante la relación sexual y se asocian con el volumen del semen, el conteo de espermatozoides y la motilidad del esperma que los obtenidos por la masturbación. Se ha postulado que esta diferencia se puede explicar por la mayor intensidad y la duración de la excitación sexual que normalmente precede a la eyaculación del coito (Elzanaty *et al*, 2008).

El semen considerado normal es una mezcla de espermatozoides suspendidos en las secreciones testiculares y epididimarias, que luego se combinan con las secreciones prostáticas, de las vesículas seminales y de las glándulas bulbouretrales. El análisis seminal por tanto permite dar información sobre la espermatogénesis y la condición fisiológica de los tejidos comprometidos (Espinoza *et al*, 2011).

Según la Organización Mundial de la Salud, las muestras de semen que se utilizarán para la evaluación de infertilidad deben obtenerse por masturbación en una habitación privada cerca del laboratorio clínico. El propósito de esta recomendación es para permitir una evaluación más eficiente de la licuefacción de la eyaculación y para evitar que estén expuestos a temperaturas extremas. Sin embargo, algunos pacientes prefieren recolectar muestras de semen en casa en lugar de en una clínica (Elzanaty *et al*, 2008).

El análisis de semen no sólo es un elemento fundamental en el estudio básico de infertilidad, sino que es clave en investigaciones epidemiológicas sobre salud reproductiva. Para garantizar un intercambio óptimo de resultados entre centros clínico o de investigación es fundamental utilizar métodos de análisis de semen estandarizados. Sin embargo, en la mayoría de los laboratorios clínicos de Latinoamérica, aún no se ha logrado una estandarización importante del análisis básico de semen (ABS) humano de acuerdo a las recomendaciones establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Cerezo *et al*, 2014).

El análisis de las características de muestras seminales es esencial para evaluar si el factor masculino tiene influencia en la infertilidad. Para el estudio de la infertilidad masculina relacionada con la calidad del semen, la Organización Mundial de la Salud, ha establecido una serie de parámetros que se debieran analizar de forma rutinaria en un laboratorio básico de andrología. Entre las características clásicas que se determinan de modo habitual, destacan el volumen del eyaculado, el pH, el número de espermatozoides por unidad de volumen, la viabilidad, la movilidad y la morfología de los espermatozoides. En general y para cada parámetro analizado, se establecen valores umbral, tanto para el estudio de caracteres cualitativos como cuantitativos (Tabla 3). Sin embargo, aún utilizando este tipo de valores, se estima que aproximadamente un 15% de los varones infértiles presentan un espermiograma normal. Por lo tanto, es verosímil que estos parámetros no sean del todo indicativos de la calidad de los espermatozoides presentes en una muestra seminal. Adicionalmente, al añadir otro tipo de parámetros tales como la integridad del acrosoma, la vitalidad, la evaluación de ciertas actividades enzimáticas o la integridad funcional de la membrana, la conclusión que se alcanza es que ningún parámetro, se puede considerar de valor diagnóstico absoluto de la infertilidad masculina (Cortés *et al*, 2007).



	1999, 4 <sup>ta</sup> edición <sup>3</sup>	2010, 5 <sup>ta</sup> edición <sup>4</sup>
	Valor de referencia	Límite inferior de referencia, LRL
Licuefacción	Total a los 60 min	Total a los 60 min
pH	7,2-7,8	≥7,2
volumen	2,0 mL	1,5 mL (1,4-1,7)
Concentración espermática	20 x 10 <sup>6</sup> /mL	15 x 10 <sup>6</sup> /mL (12-15)
Concentración total	40 x 10 <sup>6</sup>	39 x 10 <sup>6</sup> (33-46)
Motilidad total (progresivos + no progresivos)	No detallada	40% (38-42)
Motilidad progresiva	50%	32% (31-34)
Viabilidad	75%	58% (55-63)
Formas normales	15%	4% (3-4)
Leucocitos	< 1 x 10 <sup>6</sup> /mL	< 1 x 10 <sup>6</sup> /mL
Mar test	< 50 % esp. unidos a partículas	< 50 % esp. unidos a partículas
"Immunobeads"	< 50 % esp. unidos a partículas	< 50 % esp. unidos a partículas

**Tabla 3. Valores de referencia (1999) y los nuevos (2010) del límite de referencia inferior (LRI) en espermograma; entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza del 95% (Tomada de Sarabia *et al*, 2011).**

### Fragmentación de ADN espermático

Entre los nuevos procedimientos incorporados para evaluar la capacidad funcional de los espermatozoides, uno ha alcanzado una particular importancia en base a la integridad del ADN nuclear contenido en la cabeza de los espermatozoides (Cruz *et al*, 2010). Desde la década de 1980 se ha venido señalando la posibilidad de que en el espermatozoide exista un cierto número de roturas en el ADN, cuyo origen puede ser diverso y que las consecuencias de estas roturas, puedan afectar el potencial fértil del varón (Hourcade *et al*, 2010; Garrido *et al*, 2008).

Dado que la transmisión de la molécula de ADN íntegra e intacta al ovocito es esencial para la consecución y desarrollo del embarazo, su rotura podría conllevar alteraciones en la fertilización y desarrollo embrionario consiguientes. Por ello, en los últimos años también se está considerando como causa probable de infertilidad el daño del ADN espermático, y de ahí el interés en desarrollar técnicas analíticas encaminadas a medir la fragmentación del ADN espermático, e incluirlas en el estudio del factor masculino (Jun *et al*, 2011; Morales, 2007). Parece lógico asumir que la transferencia de la molécula del ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al óvulo, es crucial para conseguir una

fecundación con ciertas perspectivas de éxito. Sin embargo, resulta sorprendente que no exista una tecnología rápida para analizar la calidad del ADN en una célula tan crítica como el espermatozoide y que se pudiera utilizar con la misma facilidad con la que se procede para estudiar, por ejemplo, la motilidad de estas mismas células (Cortés *et al*, 2007).

La fragmentación de ADN de espermatozoides consta de roturas en el ADN de una cadena y de doble cadena, que se producen con frecuencia en el semen de pacientes infértiles. A pesar que el origen y los mecanismos responsables de tal anomalía genómica aún no se precisan, se ha determinado de gran importancia. Se ha propuesto que la fragmentación de ADN del espermatozoide podría ser un buen parámetro para predecir el grado de la fertilidad masculina, además de los parámetros estándar de predicción actualmente determinados en la rutina del análisis de semen. De hecho, la rotura de ADN de espermatozoide refleja, pero no se superpone exactamente a los parámetros del semen estándar lo que sugiere que es parcialmente independiente de la calidad del semen (Muratori *et al*, 2008).

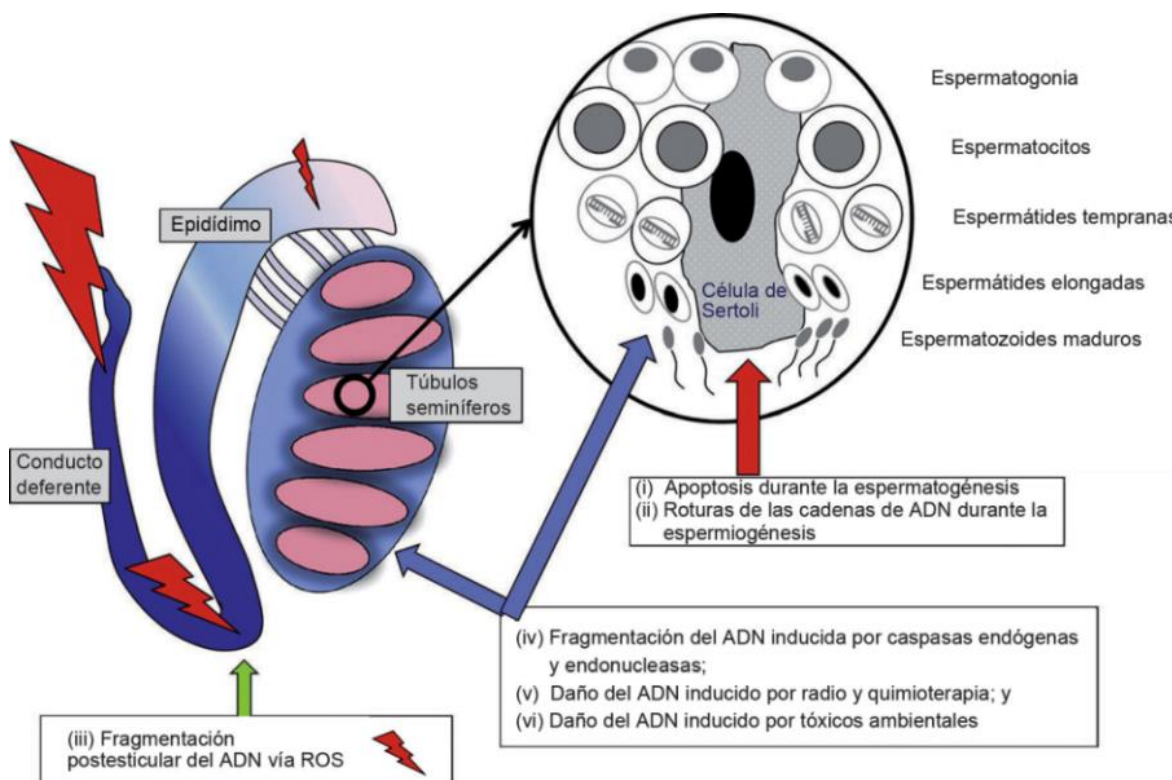
Se ha comprobado que la proporción de ADN fragmentado es mayor en espermatozoides de hombres que consultan por infertilidad, comparada con sujetos de fertilidad probada. Es decir, en hombres con semen alterado se ha encontrado mayor daño del ADN nuclear que en los hombres con semen normal (Cruz *et al*, 2010).

El origen y el impacto de la fragmentación de ADN de espermatozoide ha sido objeto de numerosos estudios. Hombres infértiles con escasa movilidad de los espermatozoides y morfología alterada han aumentado la fragmentación del ADN en comparación con los individuos con parámetros normales de semen. Sin embargo, los hombres con análisis de semen normal, también pueden tener un alto grado de fragmentación del ADN, que puede ser una causa importante de diagnosticar la infertilidad inexplicada (Chohan *et al*, 2006). Hay evidencia consistente de que un espermatozoide que contiene ADN fragmentado puede estar vivo, con movilidad, morfológicamente normal y ser capaz de fertilizar un óvulo (Tamburrino *et al*, 2012).

La espermatogénesis es el proceso de proliferación y maduración de las células germinales masculinas de espermatogonias diploides a espermatozoides maduros haploides. En cualquier etapa de este proceso se puede producir un daño en el ADN espermático (Morales, 2007).

En lo que se refiere al origen del daño en el ADN del espermatozoide, nos enfrentamos con toda seguridad a un efecto de naturaleza multifactorial no del todo delimitada (González *et al*, 2012; Cortés *et al*, 2007). Se conocen algunos factores que pueden producir daño irreversible en el ADN del gameto masculino (Gozálvez *et al*, 2008; Morales, 2007; Cortés *et al*, 2007).

El daño al ADN en los espermatozoides puede afectar al ADN mitocondrial y al ADN nuclear y puede ser inducido mediante seis mecanismos principales. Éstos pueden ocurrir durante la producción o el transporte de las células espermáticas e incluyen (Figura 10): 1) apoptosis durante el proceso de espermatogénesis; 2) roturas en las cadenas de ADN producidas durante la remodelación de la cromatina espermática durante el proceso de espermiogénesis; 3) fragmentación posttesticular del ADN inducida principalmente por radicales de oxígeno (incluidos el radical hidroxil y óxido nítrico) durante el transporte espermático a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo; 4) fragmentación del ADN inducida por caspasas endógenas y endonucleasas; 5) daño inducido por radio y quimioterapia, y 6) daño al ADN inducido por tóxicos ambientales (Robinson *et al*, 2012; González *et al*, 2012; Sakkas, 2011).



**Figura 10. Mecanismos principales de inducción de daño al ADN en espermatozoides durante la producción o el transporte de las células espermáticas (Tomada de Sakkas, 2011).**

De estos seis mecanismos, el daño postesticular durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo puede tener una participación importante en el origen de la fragmentación del ADN espermático (Sakkas, 2011).

Se sabe que la generación de radicales libres de oxígeno (ROS) o bien fallos en el intercambio correcto de la fracción histónica de la cromatina por las protaminas, pueden producir daño irreversible en el ADN del gameto. En relación directa con este tipo de acontecimientos, la presencia de apoptosis, como un suceso de muerte celular programada, tiene lugar durante el proceso de maduración espermática (Góngora *et al*, 2010). No obstante, es interesante destacar que la incidencia del fenómeno apoptótico en los espermatozoides de un eyaculado que se manipula para un proceso de reproducción asistida, generaría una serie de metabolitos que no serán retirados por tipos celulares tales como los macrófagos, hecho que ocurriría en cualquier muerte celular en el nivel

somático. Esta situación puede generar un acumulo no deseable de metabolitos altamente reactivos, tales como enzimas celulares, enzimas procedentes del acrosoma o bien nucleasas de remodelación de la cromatina tales como la topoisomerasa. Todo este tipo de acción enzimática “fuera de control” puede contribuir e incluso acelerar el proceso de degradación celular, afectando de forma indirecta, a otros espermatozoides (Cortés *et al*, 2007). También hay evidencia de que el ovocito es capaz de reparar el daño del ADN; sin embargo, el alcance de esta reparación depende del tipo de daño presente en el espermatozoide, así como la calidad del ovocito. Por lo tanto, es importante entender las posibles consecuencias de la fragmentación del ADN espermático (Tamburrino *et al*, 2012).

En este escenario, se ha sugerido que el daño provocado en la molécula del ADN del espermatozoide por razones de distinta naturaleza, puede afectar la salud del embrión, mutaciones fetales e incluso la de la descendencia global. Además, se ha propuesto que el efecto de este daño puede asociarse a enfermedades que aparecen en la descendencia, tales como la propia infertilidad, la presencia de cáncer en la niñez o bien puede relacionarse con ciertas enfermedades de impronta genómica anormal. Por otra parte, la fertilización con espermatozoides con ADN fragmentado resulta en mal desarrollo embrionario, disminución de la implantación, las tasas de embarazo más bajas, y las pérdidas de embarazos recurrentes. Adicionalmente, existen causas de naturaleza exógena a la propia dinámica de formación del gameto tras el proceso meiótico, que resultan en un incremento notable en el daño que se observa en el ADN de un espermatozoide. De esta forma, el uso de ciertos fármacos, la contaminación atmosférica, el tabaquismo, los episodios de fiebre alta, una temperatura testicular elevada, anomalías anatómicas tales como el varicocele, o una edad avanzada, contribuyen de forma notable a incrementar las tasas de daño registrado en el ADN del espermatozoide (González *et al*, 2012; Morales, 2007; Cortés *et al*, 2007; Chohan *et al*, 2006).

La cantidad de fragmentación del ADN espermático impacta negativamente sobre la fertilización, el desarrollo del embrión y la tasa de embarazo es aún motivo de

controversia. Tales resultados contradictorios se han atribuido a diferentes causas, incluyendo las diferentes poblaciones de espermatozoides utilizados para la detección de la fragmentación del ADN (semén sin procesar o espermatozoide seleccionado), y las diferentes técnicas utilizadas para determinar el daño del ADN (Muratori, 2008).

Por lo tanto, parece lógico para evaluar la integridad de la cromatina de los espermatozoides en los hombres infértiles antes de la reproducción asistida (Chohan *et al*, 2006).

### **Técnicas de evaluación de la fragmentación del ADN espermático**

Las técnicas que existen para estudiar la fragmentación del ADN espermático se pueden dividir en dos grupos. En primer lugar se encuentran aquellas que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos. En este grupo se encuentran las siguientes (Morales, 2007):

- SCSA o Ensayo de estructura de la cromatina espermática
- DBD-FISH o Detección de rotura de ADN-Hibridación In Situ Fluorescente
- SCD o Dispersión de la cromatina espermática
- Ensayo cometa

Y en el segundo grupo se incluyen aquellas que marcan las roturas en la cadena de ADN, porque incorporan moléculas marcadas con fluorocromos en los extremos de rotura (Morales, 2007):

- TUNEL (Corte Terminal dUTP-Final Etiquetado)
- ISNT (Traducción Corte In Situ)

Estas técnicas, a excepción del ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA), carecen de protocolos estandarizados para que todos los usuarios puedan minimizar las variaciones entre laboratorios (Muratori *et al*, 2010).

### SCSA o Ensayo de estructura de la cromatina espermática

Incluso en hombres fértiles sanos, al menos 6% de los espermatozoides llevan un número anormal de cromosomas. Después de reconocer que los parámetros de la calidad del espermatozoide humano utilizados rutinariamente no están estrechamente relacionados con la aparición de contenido de ADN anormal en espermatozoides, se han introducido una serie de técnicas en la investigación y la práctica clínica. La citometría de flujo ofrece una manera rápida y sencilla para determinar la cantidad de espermatozoides y el grado de daño en el ADN, pero la medición precisa del contenido de ADN se encuentra con dificultades derivadas de la forma aplanada especial de espermatozoides humanos y de la fuerza la naturaleza compacta de ADN de espermatozoide (Kovacs *et al*, 2008).

La citometría de flujo es una técnica de estudio y de detección rápida y sencilla de determinados parámetros de células (o de partículas) cuando fluyen a través de un punto donde se cruzan con un láser. Esta característica permite que la detección y medida de dichos parámetros se realice de modo individual para cada una de las partículas implicadas, logrando así realizar un posterior análisis estadístico de los datos mucho más exhaustivo y preciso, además, el gran número de partículas analizadas de forma simultánea confieren a esta técnica una gran solidez. Mediante la citometría de flujo se pueden realizar numerosos tipos de ensayo, como la estimación del contenido en ácidos nucleicos, actividad enzimática, flujo de calcio, potencial de membrana y pH (Canda, 2007).

La utilización de fluorocromos se basa en la particularidad de ciertas moléculas para emitir luz a una longitud de onda determinada cuando son excitadas por un haz de luz con menor longitud de onda (y por tanto con mayor capacidad energética). Estas propiedades se encuentran en moléculas como el Isotiocianato de fluoresceína (FITC) o la ficoeritrina (PE), u otros compuestos de nueva generación. Habitualmente estas moléculas se emplean unidas covalentemente a anticuerpos que reconozca específicamente la característica que a analizar (una proteína, un lípido, etc). Además, la adecuada

combinación de los fluorocromos y la detección de moléculas en las células permiten el análisis de varios parámetros de forma simultánea (Canda, 2007).

Cuando las células o partículas a analizar atraviesan el punto de detección, la luz del láser es dispersada por la propia célula detectándose tanto la dispersión frontal (“Forward Scatter” o FSC), que da una idea del volumen; como la dispersión lateral (“Side Scatter” o SSC), que informa de la complejidad. La representación gráfica de estos dos parámetros permite diferenciar las poblaciones a analizar y, en todo caso, permite descartar la información procedente de restos celulares, agregados del medio extracelular o células apoptóticas que puedan alterar el análisis. Si la intención es la de detectar una determinada molécula en particular sólo se necesita utilizar un anticuerpo marcado con un fluorocromo. El citómetro detecta la emisión de luz del fluorocromo cuando éste es activado por la luz del láser; esta señal de emisión es filtrada, amplificada y detectada a diferentes longitudes de onda, y toda esta información es procesada por un sistema informático (Figura. 11) (Canda, 2007).

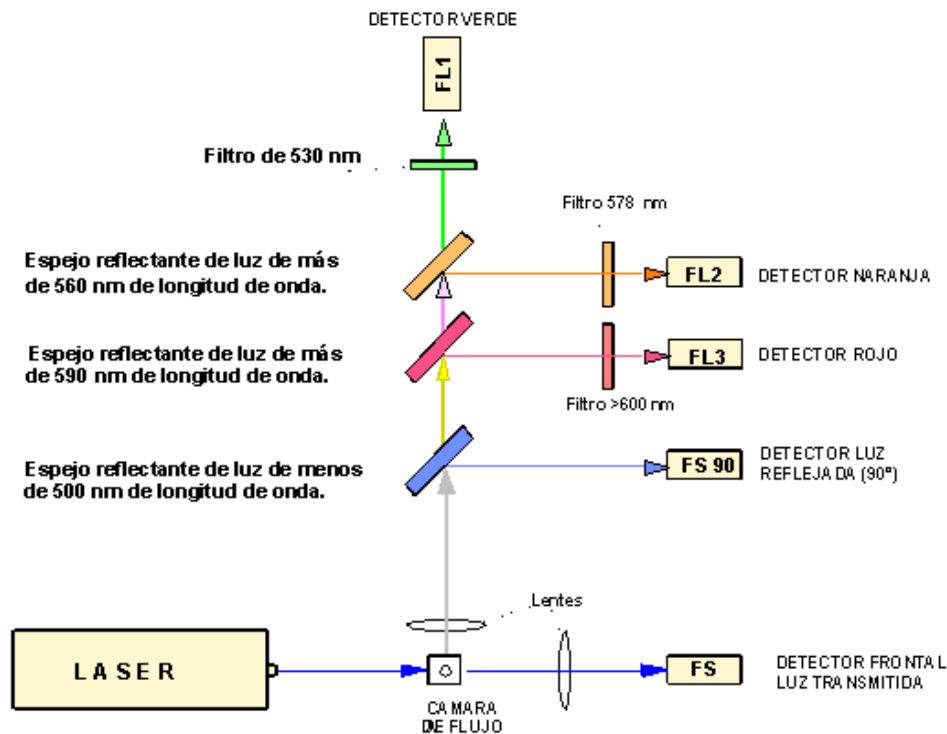


Figura 11. Esquema del funcionamiento de un citómetro de flujo (Tomada de Centro Nacional de Biotecnología, S.f)



La citometría de flujo creciente ha ganado atención en el campo de la andrología en los últimos 15 años. Hay docenas de aplicaciones de la citometría de flujo para el análisis de los espermatozoides (Robles *et al*, 2013; Gillan *et al*, 2006). El SCSA es el ensayo pionero para la detección de ADN dañado y proteínas alteradas en núcleos de los espermatozoides a través de citometría de flujo de espermatozoides teñidos de naranja de acridina (AO). Se considera que es la prueba más precisa y repetible, proporciona datos de parámetros muy singular, dual (fluorescencia roja vs. fluorescencia verde) en una escala de canal 1024 × 1024, no sólo en la fragmentación del ADN, sino también en el espermatozoide anormal caracterizado por la falta de la normalidad en el intercambio de histonas a protaminas (Evenson, 2013)

SCSA es una prueba fluorocitométrica donde las rupturas del ADN espermático son evaluadas indirectamente a través de la desnaturalización del ADN. El ensayo mide la susceptibilidad al ácido, induciendo la desnaturalización del ADN, siguiendo con la tinción con el colorante fluorescente naranja de acridina (Bungum, 2012; Gillan *et al*, 2006). Este fluorocromo se intercala entre las dos cadenas de ADN y al ser excitado emite una longitud de onda de 530 nm y se visualiza de color verde, mientras que al intercalarse en el ADN de cadena sencilla (ADN desnaturalizado) emite una longitud de onda de 640 nm (color rojo) (Figura 12). Las células se separan por citometría de flujo. El ADN fragmentado es más susceptible a ser desnaturalizado y por tanto se visualizaría en color rojo (Morales, 2007). Usando el citómetro de flujo son analizadas de 5000-10000 espermatozoides en pocos segundos y esto provee un menor resultado subjetivo comparado con el análisis OMS donde únicamente son analizadas 1-300 células (Bungum, 2012).

Los estudios con ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA) han establecido un valor umbral clínico por encima del cual el éxito reproductivo se deteriora. Sin embargo, no se ha llegado a un consenso mundial sobre el valor diagnóstico y pronóstico de la fragmentación del ADN espermático (Muratori *et al*, 2010).

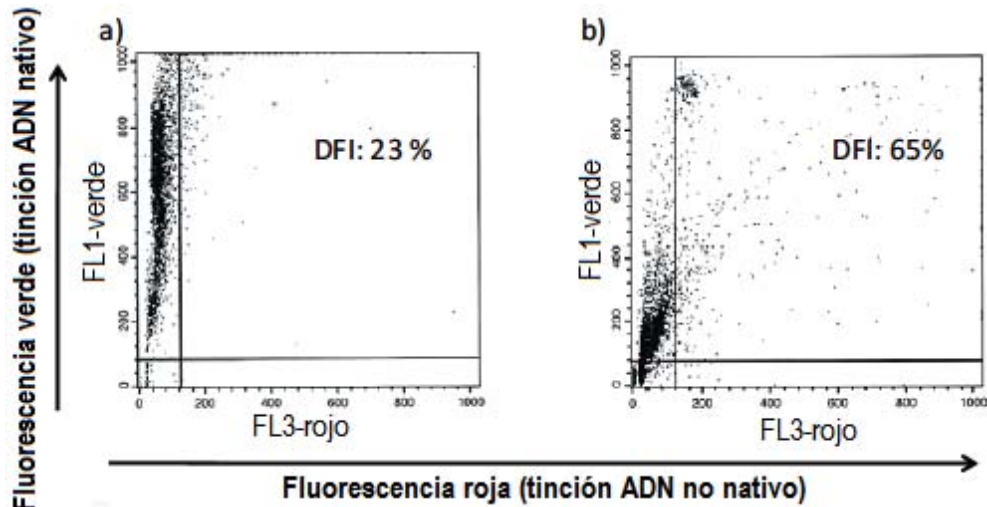


Figura 12. Diagrama de puntos que muestran la fluorescencia (tinción con anaranjado de acridina) para muestras con a) bajos (grupo A) y b) altos DFI (grupo B). (Tomada de Cruz, 2010).

### Relación entre fragmentación del ADN espermático y potencial fertilizante del espermatozoide

Se han realizado varios trabajos que evidencian la relación existente entre la integridad del ADN espermático y la fertilidad. Estos trabajos demuestran que los varones infértiles tienen una mayor fracción de espermatozoides con roturas en el ADN, y se ha intentado establecer un punto de corte por encima del cual el pronóstico sería desfavorable (Morales, 2007).

En Europa y EEUU se llevaron a cabo de forma independiente estudios sobre la relación entre los resultados de la técnica SCSA y la capacidad fertilizante. Demostraron que un índice de fragmentación del ADN (DFI) superior al 30-40% es incompatible con la fertilidad in vivo, independientemente de la concentración, motilidad y morfología espermática (Morales, 2007).

Se puede calcular el DFI, que resulta de la relación entre la fluorescencia roja y la fluorescencia total (roja más verde) expresada en porcentaje, de tal manera que:

$$DFI = \frac{\text{Roja}}{\text{Roja} + \text{Verde}} \times 100$$

Evenson y col. (2002), usando esta técnica establecieron cuatro categorías para el potencial fertilizante del espermatozoide según el DFI:

- Excelente si DFI < 15%
- Alto si DFI 15-24%
- Bajo si DFI 25-30%
- Muy bajo si DFI > 30%

### DBD-FISH o Detección de rotura de ADN-Hibridación In Situ Fluorescente

Se trata de una metodología relativamente reciente y que se circunscribe al campo de la investigación. Se fundamenta en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas de producir una desnaturalización del ADN a partir de los extremos de roturas de doble cadena o de cadena sencilla, o bien lugares sensibles al álcali. Después de la desnaturalización y extracción de las proteínas utilizando una solución de lisis, el ADN generado de cadena sencilla, puede hibridarse con una sonda de ADN (Figura 13). Cuantas más roturas existan en dicha cadena, mayor será el nivel de marcado que se obtenga en el núcleo. Al igual que las técnicas de TUNEL o ISNT, la técnica de DBD-FISH no se puede considerar de aplicación rutinaria por razones similares a las descritas previamente. Desde el punto de vista de la investigación, tiene mucho interés, ya que es la única técnica disponible que permite evaluar daño de célula a célula, in situ, en secuencias específicas del ADN (Cortés *et al*, 2007).

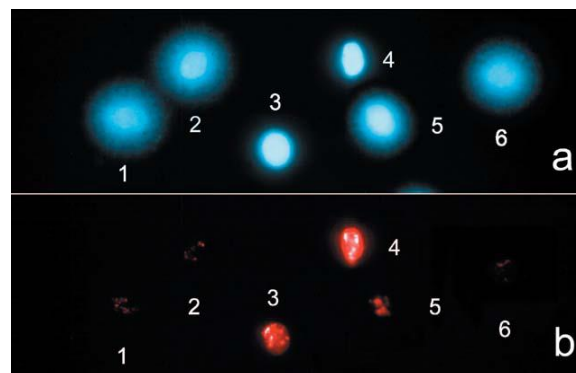


Figura 13. Visualización de la integridad del ADN mediante el método de SCD combinado con DBD-FISH. (Tomada de Cortés, 2007).

### SCD o Dispersión de la cromatina espermática

Esta técnica consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina en aquellos espermatozoides que tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen. Este efecto se consigue mediante un tratamiento ácido seguido de una desproteinización, de forma que los espermatozoides con fragmentación no liberan bucles de ADN y no generan un halo de dispersión de la cromatina. Por el contrario los que no están fragmentados dan lugar a grandes halos de dispersión que corresponden a bucles de ADN (Figura 14) (Morales, 2007).

**Análisis visual directo.** El nucleoide, que corresponde al núcleo masivamente desproteinizado del espermatozoide, se compone de dos partes: silueta del núcleo del espermatozoide, denominada core, en posición central, y un halo periférico de dispersión de la cromatina/ADN. La cola del espermatozoide es visible.

$$\text{SCD (\%)} = \frac{100 \times \text{No. de espermatozoides con ADN fragmentado}}{\text{No. de espermatozoides estudiados}}$$

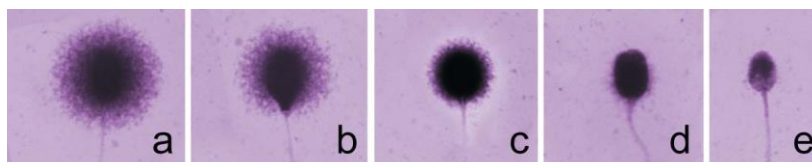


Figura 14. Visualización de la integridad del ADN mediante el test SCD. a y b muestran ADN íntegro. c, d y e presentan ADN fragmentado (Tomada de Cortés, 2007).

### Ensayo cometa

En realidad este ensayo es una adaptación de la electroforesis de ADN desnudo, comúnmente utilizada en biología molecular, al campo de la biología celular. La idea es que el ADN de un núcleo desproteinizado que contenga roturas en sus cadenas de ADN, estará mas libre para ser movilizado hacia el polo positivo, cuando éste se someta a un campo eléctrico. La metodología básica consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfidrilos que se

encuentran en la protaminas del espermatozoide, como por ejemplo DTT (dithiothreitol). Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sustancias fluorescentes del tipo DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole), IP (Ioduro de Propidio) o SYBR-GREEN (Synergy Brand). De esta forma, el ADN fragmentado se desplaza generando una imagen similar a la de un cometa. Aquellos espermatozoides con su ADN integro no generan o sólo producen imágenes de discretas colas de cometa, mientras que aquellos núcleos que tienen su ADN dañado muestran un claro desplazamiento de los múltiples fragmentos de ADN (Figura 15) (Cortés *et al*, 2007).

La detección de la migración del ADN alterado depende de varios parámetros, tales como: la concentración de la matriz de agarosa, el pH, la temperatura y duración del desenrollamiento, voltaje, amperaje y duración de la electroforesis (Arencibia *et al*, 2003).



Figura 15. Visualización de la integridad del ADN mediante el ensayo de cometas. (Tomada de Cortés, 2007).

### TUNEL o Marcación de extremos rotos de ADN por transferasa terminal y dUTP

El Tunel consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con un fluorocromo en los extremos 3'-OH de las roturas existentes en el ADN, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se lleva a cabo mediante una transferasa terminal (Deoxynucleotidyl Transferase o TdT) (Figura 16). La señal es mayor cuanto mayor sea el grado de fragmentación del ADN. Esta técnica fue desarrollada para identificar una población apoptótica de espermatozoides en el eyaculado. Posteriormente numerosos estudios han usado la misma técnica, sin embargo, se demostró que la fragmentación del ADN medida mediante TUNEL no estaba siempre asociada con un fenómeno apoptótico en los

espermatozoides del eyaculado si no que se debía a una maduración espermática defectuosa por un empaquetamiento incorrecto de la cromatina (Morales, 2007).

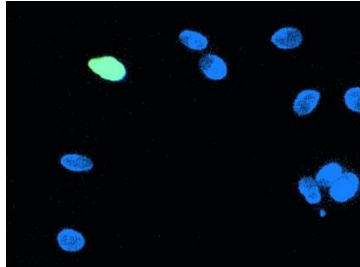


Figura 16. Visualización de la integridad del ADN mediante TUNEL. (Tomada de Instituto Bernabeu, 2010).

### Prueba de ISNT (Traducción Corte In Situ)

La ISNT es básicamente una técnica de concepción similar al TUNEL ya que permite cuantificar el grado de daño que se produce en el ADN evaluando tras la incorporación de moléculas de dUTP modificado con botina o digoxigenina, o bien marcado directamente el ADN con un fluorocromo conjugado con un nucleótido modificado, tras utilizar la enzima ADN polimerasa I. La mayor diferencia con el TUNEL radica en que, en este caso, existe una actividad enzimática exonucleasa y la incorporación de nucleótidos es mayor por utilizar la cadena de ADN complementaria como molde. Los resultados del análisis de ISNT se han utilizado para el estudio de la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide. Desde el punto de vista práctico, esta técnica tendría las mismas prestaciones e inconvenientes que la de TUNEL, pero no existe disponible de modo comercial para su aplicación directa sobre espermatozoides (Cortés *et al*, 2007).

Las dos pruebas más utilizadas para medir el daño del ADN del espermatozoide son Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) y el ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA). Las pruebas de ADN por SCSA se ha estandarizado ampliamente. La prueba TUNEL no se ha estandarizado en la misma medida como SCSA y pocos laboratorios han intentado utilizar esta prueba en un entorno clínico, lo que limita su uso en pacientes (Sharma *et al*, 2010; Grunewald-Sharma *et al*, 2009).

SCSA, TUNEL y SCD son herramientas de diagnóstico sensibles para detectar la fragmentación del ADN en los espermatozoides. La técnica de Naranja de Acridina, por otro lado está asociado con más variabilidad (Chohan *et al*, 2006). En la tabla 4 se muestran las ventajas, desventajas y observaciones de las técnicas utilizadas para evaluar alteraciones en el ADN de espermatozoides.

MÉTODO	INSTRUMENTAL	VENTAJAS	DESVENTAJAS	UTILIDAD CLÍNICA
TUNEL	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopio de fluorescencia</li> <li>Citometría de flujo</li> </ul>	Cumple con parámetros de control de calidad	Equipo sofisticado y costoso	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fertilidad masculina.</li> <li>Reproducción asistida.</li> <li>Pérdidas fetales.</li> </ul>
ISNT	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopio de fluorescencia</li> <li>Citometría de flujo</li> </ul>	Reacción de marcaje directo.	Equipo sofisticado y costoso	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fertilidad masculina.</li> </ul>
<b>Metodologías que se basan en la susceptibilidad del ADN para desnaturalizarse</b>				
SCSA	<ul style="list-style-type: none"> <li>Citometría de flujo</li> </ul>	Punto de corte establecido (30%) para diferenciar pacientes fértiles e infértiles.	Instrumentación costosa. Capacitación técnica.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Recomendada en estudios epidemiológicos de infertilidad.</li> </ul>
COMETA	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopio de fluorescencia</li> <li>Electroforesis ADN</li> </ul>	Bajo costo.	Lento de ejecución. Requiere observador con experiencia.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fertilidad masculina.</li> <li>Reproducción asistida.</li> <li>Criopreservación de espermatozoides</li> </ul>
SCD	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopio de fluorescencia campo claro</li> </ul>	Análisis simple de resultados. Bajo costo.	Aún no determinada.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aún no determinada.</li> <li>Varicocele.</li> </ul>
DBD-FISH	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopia de fluorescencia</li> </ul>	Revela modificaciones estructurales de la cromatina.	Procedimiento sofisticado y costoso.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aún no determinada.</li> </ul>
<b>Otros Métodos</b>				
NA	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopio de fluorescencia</li> <li>Citometría de flujo</li> </ul>	Bajo costo.	Subjetiva. Poco reproducible.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diferencias significativas en patologías andrológicas.</li> </ul>
AT	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopio campo claro</li> </ul>	Método simple y de bajo costo.	Subjetiva. Poco reproducible.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Evaluación de anomalías en la cromatina.</li> </ul>
CMA	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopio de fluorescencia</li> </ul>	Método simple y de bajo costo.	Subjetiva. Poco reproducible.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Evaluación de anomalías en la cromatina.</li> </ul>

**Tabla 4. Resumen de las metodologías utilizadas para evaluar alteraciones en el ADN de espermatozoides, así como de algunas de sus ventajas e inconvenientes y su aplicación clínica de rutina (Tomada de Cortés et al, 2007).**

### Apoptosis

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular programada que se produce en todo el cuerpo, regula el recuento de células y elimina las células innecesarias que comprometen la supervivencia. Se trata de una serie de eventos bioquímicos que desencadenan alteraciones celulares llevando eventualmente a la terminación celular. Morfológicamente, la apoptosis se caracteriza por la condensación de la cromatina nuclear, el encogimiento celular, la formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación del ADN (Rahimipour, 2013; Said *et al*, 2010).

El cuerpo de un organismo multicelular se compone de trillones de células. Un gran número de estas células mueren cada día para mantener la homeostasis del tejido entre proliferación y muerte celular a fin de garantizar la población adecuada en cada momento. Para esto, se requiere un proceso de muerte, que no se monta una respuesta inmune protegiendo así las células vecinas. La muerte celular puede ocurrir a través de varios procesos, entre las que destacan la necrosis, apoptosis, autofagia y entosis. La necrosis se produce cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental, es causada por factores externos, tales como la infección, toxinas o trauma y por lo general provoca una respuesta inmune, mientras que la muerte por apoptosis, efectuada por un programa celular llamada muerte celular programada, es un tipo de muerte que no causa la lisis celular y por lo tanto no inicia una reacción inflamatoria (Shaha, 2010; Lizarbe, 2007).

La apoptosis es el proceso más estudiado de la muerte celular, y el tejido en el que se produce una alta incidencia de apoptosis en el cuerpo de los vertebrados es el testículo, donde el 75 % de todas las células germinales masculinas producidos se desechan a través del proceso de apoptosis (Rahimipour *et al*, 2014; Shaha, 2010).

La apoptosis es uno de los mecanismos de muerte celular conocida con necrosis y está regulada por varios genes y moléculas que juegan un papel importante en la iniciación de la apoptosis (Dogan *et al*, 2013).



La necrosis es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos o, por ejemplo, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias. Los cambios morfológicos se observan en la Figura 17 (Lizarbe, 2007).

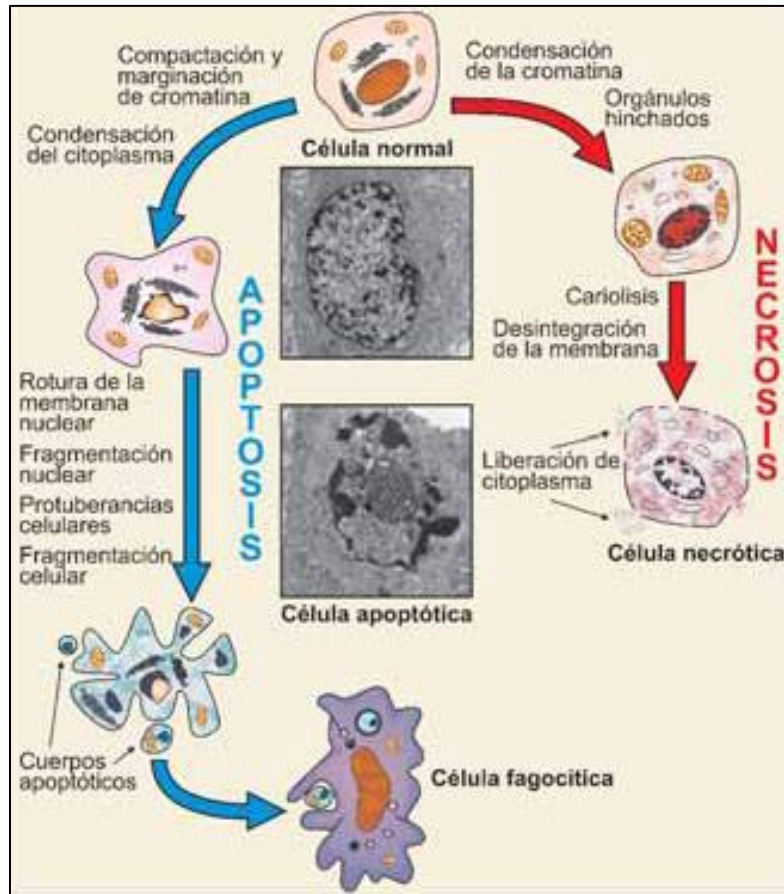


Figura 17. Esquema comparativo de las características morfológicas de la muerte celular por apoptosis y por necrosis. Los diagramas muestran los cambios morfológicos que se observan en las células apoptóticas y en las necróticas (Tomada de Lizarbe, 2007).

La apoptosis se ha implicado en el daño a la cromatina de los espermatozoides; no está claro si la apoptosis se produce a través de vías citoplasmáticas o mitocondriales (Kim, 2013). Aunque existe un consenso sobre la implicación de la apoptosis en la infertilidad masculina, el mecanismo exacto de su participación aún no se han dilucidado. Disminución de la fertilización potencial de espermatozoides apoptóticos puede ser un factor contribuyente (Grunewald, 2009; Paasch-Grunewald *et al*, 2004).

Existe un interés creciente en el valor pronóstico de los ensayos de integridad del ADN en la reproducción humana y la toxicología. Daños en la cromatina espermática se asocian con mayor riesgo de abortos espontáneos y el desarrollo embrionario alterado (Zini *et al*, 2011).

El daño en el ADN y la apoptosis de espermatozoides han sido considerados como indicadores potencialmente útiles de la fertilidad masculina. La apoptosis celular, es el desmontaje controlado de células desde el interior, se caracteriza por una cascada de eventos que incluyen la condensación y la fragmentación de la cromatina, compactación de los orgánulos citoplasmáticos, la reducción de potencial transmembrana mitocondrial, la liberación mitocondrial de citocromo c, la producción de especies reactivas del oxígeno, la dilatación de los el retículo endoplasmático, y una disminución en el volumen celular (Aitken *et al*, 2011; Hoogendijk, 2009; Young *et al*, 2003).

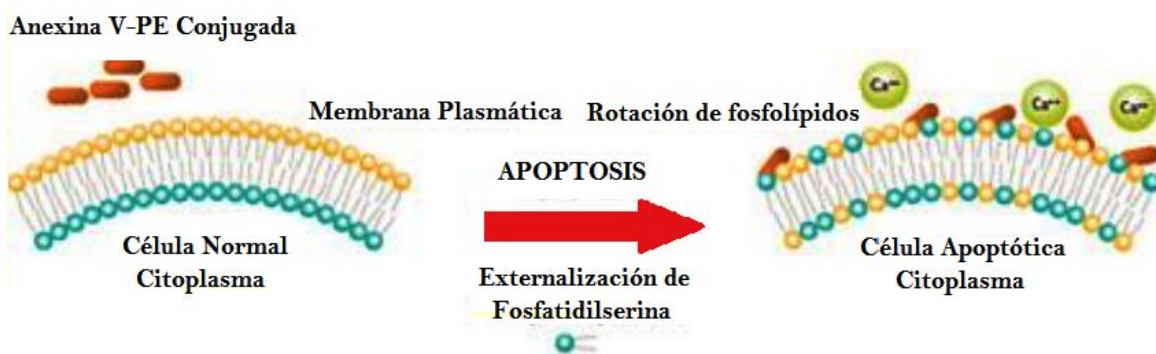
La apoptosis se caracteriza por cambios de la membrana plasmática. Una primera señal de la apoptosis es la translocación de fosfatidilserina (PS), que es un fosfolípido cargado negativamente, de la ubicación normal en el prospecto interior de la membrana plasmática hacia el lado exterior de la misma. La externalización de la fosfatidilserina (fosfolípido normalmente confinado a la cara interna de la membrana plasmática) es el resultado de un balance, regulado por los niveles de calcio intracelulares, entre la actividad de la aminofosfolípido translocasa y la escramblasa. En las células apoptóticas se inhibe la aminofosfolípido translocasa y se activa la escramblasa produciéndose una pérdida de la asimetría de la membrana plasmática (Lizarbe, 2007). La fosfatidilserina queda expuesta en la superficie de la membrana externa (Figura 18). Tiene una alta afinidad a la anexina V (AV), una proteína de unión de fosfolípidos de aproximadamente 35 kDa y carece de la capacidad de pasar a través de la membrana de espermatozoides intactos, se puede utilizar para marcar los espermatozoides con PS externalizada. Esta unión es un marcador temprano de la apoptosis. Los marcadores de la apoptosis terminal incluyen la caspasa-3 activada, la pérdida de la integridad del potencial de membrana mitocondrial, y la fragmentación del ADN, que se expresan por proporciones variables de semen eyaculado (Hoogendijk, 2009; Grunewald, 2009).



**Figura 18. A. Espermatozoide con externalización de PS. B. Espermatozoide con externalización de PS unido a AV. (Tomada de Genivity, 2013).**

Además de los cambios de asimetría en la membrana plasmática por la translocación de fosfatidilserina se utiliza otro marcador de apoptosis temprana, el potencial de membrana mitocondrial (MMP). La evaluación del MMP en el espermatozoide es importante teniendo en cuenta la funcionalidad de las mitocondrias durante la apoptosis. La desnaturalización del ADN está potencialmente relacionada con apoptosis tardía (Zorn *et al*, 2012).

La anexina V es una proteína de unión dependiente de fosfolípido de 35-36 kDa  $Ca^{2+}$  que tiene una alta afinidad por la PS, y se une a las células con PS expuesta (Figura 19). La anexina V se puede conjugar con fluorocromos incluyendo ficoeritrina (PE). Este formato conserva su alta afinidad por el PS y por lo tanto sirve como una sonda sensible para el análisis de citometría de flujo de células que están experimentando apoptosis. Desde que la externalización de PS se produce en las primeras etapas de la apoptosis, la tinción de PE Anexina V puede identificar la apoptosis en una fase anterior que los ensayos basados en los cambios nucleares tales como la fragmentación del ADN (BD Biosciences, 2008).



**Figura 19. Externalización de Fosfatidilserina (Tomada de Leimgruber, s.f.).**

La tinción con anexina V PE precede a la pérdida de integridad de la membrana que acompaña a las últimas etapas de la muerte celular resultante de los procesos o bien apoptóticos o necróticos. Por lo tanto, la tinción con PE anexina V se utiliza típicamente en conjunción con un colorante vital como 7-amino-actinomicina (7-AAD) para permitir al investigador a identificar las células apoptóticas tempranas (7-AAD negativa, PE Anexina V positivo). Las células viables con membranas intactas excluyen 7-AAD, categorizado como las membranas de las células muertas y dañadas son permeables al 7-AAD (BD Biosciences, 2008).

El 7-AAD es un tinte de ácido nucleico que se puede utilizar en lugar de yoduro de propidio (PI) para la exclusión de células no viables en ensayos de citometría de flujo. La ventaja de 7-AAD sobre PI es la capacidad de ser utilizado en conjunción con ficoeritrina. El 7-AAD fluorescente se detecta en el rango rojo del espectro (filtro de 650 nm). Este reactivo se utiliza como una sonda de viabilidad para los métodos de exclusión de células muertas, basado en dispersión de luz y absorción de 7-AAD como se detecta en FL3 (BD Biosciences, 2011).

La construcción de una base de conocimientos sobre los componentes moleculares del programa de apoptosis en las células de espermatogénesis en diferentes condiciones es un paso esencial para el desarrollo de nuevos regímenes terapéuticos de enfoques específicos de la anticoncepción masculina y el tratamiento de los tumores de células germinales e infertilidad (Shaha, 2010).

### **Criopreservación**

La criopreservación de espermatozoides ha sido una herramienta importante en la tecnología de reproducción asistida (ART). Es una metodología crítica necesaria para apoyar la investigación biomédica. El desarrollo del protocolo de preservación se ha centrado en la superación de la muerte celular inducida por la congelación principalmente debido a la formación de hielo intracelular y el estrés quimio-osmótico, que conducen a la

ruptura de la membrana plasmática y posterior necrosis (Petyim *et al*, 2014; Saritha *et al*, 2001; Baust *et al*, 1999).

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas o cerca de la temperatura de nitrógeno líquido (Saritha *et al*, 2001; Baust *et al*, 1999). Se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones. Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (Di Santo *et al*, 2012; Riel *et al*, 2011; Ávila *et al*, 2006).

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas. El entender y aplicar adecuadamente la criopreservación de material biológico es fundamental para los bancos de células germinales masculinas (espermatozoides) (Ávila *et al*, 2006).

La conservación de semen se encuentra disponible en muchos centros con las indicaciones siguientes (Petyim *et al*, 2014; Dohle, 2010; Serzedello *et al*, 2006):

- Antes de un tratamiento potencialmente esterilizante con quimio o radioterapia por un cáncer o por enfermedades no malignas.
- Antes de cirugía que podría interferir en la fertilidad (por ejemplo, cirugía del cuello de la vejiga en un varón joven o extirpación de un testículo en un varón con cáncer de testículo).

- En varones con deterioro progresivo de la calidad del semen como consecuencia de enfermedades que entrañan un riesgo de azoospermia posterior (por ejemplo, macroadenoma hipofisario, craneofaringioma, síndrome de la silla turca vacía, nefropatía crónica, diabetes mellitus no controlada o esclerosis múltiple).
- En varones con paraplejía cuando se ha obtenido semen mediante electroeyaculación.
- En varones con aneyaculación psicógena, tras haber obtenido semen mediante electroeyaculación o un procedimiento de recogida de espermatozoides.
- Después de que un tratamiento con gonadotropinas ha inducido la espermatogénia en varones con hipogonadismo hipogonadotrópico.
- En los varones con ANO (azoospermia no obstructiva), la probabilidad aproximada de encontrar espermatozoides con micro-ETE (extracción testicular de espermatozoides) es del 60% a 70%; la criopreservación puede utilizarse para conservar espermatozoides para su utilización en IICE (Inyección intracitoplasmática de espermatozoides), con lo que se evita una hiperestimulación innecesaria de la pareja. También se puede emplear para evitar repetir los procedimientos de recogida de espermatozoides.
- En cualquier situación en la que se ha obtenido semen mediante un procedimiento de recogida de espermatozoides (por ejemplo, tras el fracaso de la corrección de una vasectomía o en algunos casos de obstrucción epididimaria no susceptible de cirugía).
- Para la conservación de espermatozoides de donante; la crioconservación y un período de cuarentena de 3-6 meses reducen el riesgo de transmisión de infecciones a partir de los donantes de semen; en la mayoría de los países ya no se utiliza semen fresco.

### Agentes crioprotectores (ACP)

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (Ávila *et al*, 2006).

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 (DMSO). Los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular (Ávila *et al*, 2006).

- **Agentes crioprotectores penetrantes**

Son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Son utilizados: el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH) (Ávila *et al*, 2006).

El DMSO es un solvente bipolar que no forma puentes de hidrógeno, hidrosoluble y de bajo peso molecular. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. Se han sugerido las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la membrana. El 1-2. propanediol ha sido utilizado principalmente para congelación de blastocistos y embriones en estado de preimplantación de humanos y otras especies (Ávila *et al*, 2006).



- **Agentes crioprotectores no penetrantes**

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. La adición del criopreservante genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACP y después se hidrata (Ávila *et al*, 2006).

### **Métodos de criopreservación**

Constantemente se modifican los procedimientos de congelamiento a fin de obtener mejores resultados en los indicadores de funcionalidad espermática, para lograr de esta forma mayores porcentajes de embarazos. Las causas más frecuentes de pérdida de la función celular producidas por congelamiento, son alteraciones de la membrana plasmática, daño mitocondrial, deterioro en la integridad del ADN y aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), todas con un efecto negativo sobre los indicadores esenciales para la fecundación (Berrios *et al*, 2011).

Los métodos de congelación se clasifican de acuerdo a la velocidad de congelamiento y descongelamiento; existe la congelación lenta-descongelación lenta, congelación lenta-descongelación rápida en las cuales la adición del crioprotector suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable. La descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 37°C para evitar la recristalización (Gallardo *et al*, 2012; Ávila *et al*, 2006).

Se ha descrito un método de criopreservación rápida que consiste en la exposición directa de la célula a nitrógeno líquido o a sus vapores, evitando así la cristalización del agua intracelular. Uno de los principios en que se basa este método es el enfriamiento rápido de las células inmersas en una solución que lleva incorporado crioprotectores no

permeables en alta concentración. La mezcla al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa de líquido a un estado sólido (Berrios *et al*, 2011).

La congelación rápida implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente DMSO y sacarosa, seguida de inmersión en nitrógeno líquido (Ávila *et al*, 2006).

Se ha logrado congelar espermatozoides mediante aplicación directa de la solución espermática dentro de nitrógeno líquido, con crioprotectores no permeables utilizados en bajas concentraciones o sin la presencia de ellos. Este método ha hecho posible obtener porcentajes de viabilidad y movilidad aceptables, como también bajos porcentajes de fragmentación de ADN, lo que podría posibilitar el uso de estos espermatozoides en técnicas de reproducción asistida. No obstante, persiste un porcentaje cercano al 40% de células con daño a la membrana plasmática que posiblemente este asociado al incremento de las especies reactivas de oxígeno que se produce posterior a la descongelación (Berrios *et al*, 2011).

### **Congelación de espermatozoides**

La congelación de espermatozoides se define como el tratamiento empleado para la conservación y el mantenimiento de espermatozoides a temperaturas de -196 °C (Meseguer *et al*, 2002).

A pesar de que los espermatozoides fueron los primeros tipos de células criopreservadas, intentos de mejoramiento para su criopreservación son objeto de investigación, principalmente por la pobre sobrevivencia de estas células en pacientes con infertilidad y problemas oncológicos. El éxito relativo de la criopreservación del semen ha mostrado avances significativos en el intercambio internacional de animales genéticamente superiores, biotecnología, conservación de especies en extinción y medicina reproductiva humana (Ávila *et al*, 2006).

Durante todo el proceso de congelación, las células están sometidas a un estrés fisicoquímico que puede perjudicarlas. Además, es importante conocer la dinámica de la formación de cristales de hielo, así como los cambios de temperatura y los cambios de concentración de solutos que se producen (Meseguer *et al*, 2002).

La criopreservación de espermatozoides humanos ha evolucionado empíricamente, usando tasas de congelamiento de hasta 100-200°C/min y medios basados en glicerol con citrato de yema de huevo, sin embargo otros estudios sugieren tasas de sobrevivencia exitosa utilizando etilenglicol. Sin embargo, estos protocolos deben ser reexaminados con estrecha atención al daño causado por la criopreservación. La caracterización de la criobiología del espermatozoide se empezó hace aproximadamente veinte años, determinando diferentes parámetros de los espermatozoides, entre ellos los cambios bioquímicos, estatus energético, integridad de la membrana, temperatura de transición de fase de la membrana lipídica, integridad de elementos subcelulares y morfología de acrosoma. Cuando el ACP es agregado de forma abrupta se puede observar daño en la membrana plasmática, región acrosomal y configuración de la cola (Ávila *et al*, 2006).

El método empleado para la congelación de semen requiere una serie de fases (Meseguer *et al*, 2002):

- Dilución en crioprotector.
- Congelación (vapores de nitrógeno, hielo seco, descensos programados de temperatura, etc.).
- Envasado (criotubos, gobelets, pajuelas ampollas).
- Mantenimiento a bajas temperaturas (en los bancos de nitrógeno).
- Descongelación (velocidad de descongelación).

El proceso de congelación de semen ha sido ampliamente estudiado y en su conjunto la metodología está bien protocolizada. Sin embargo, en el caso de la descongelación, es necesario aclarar la participación de diversos factores como temperatura de descongelación (constante 37 °C o con cambios graduales 4, 20 y 37 °C), velocidad de

descongelación (lenta frente a rápida) y velocidad con la que se congeló (lenta, rápida) sobre la motilidad, vitalidad y morfología de los espermatozoides (Oliva *et al*, 2010).

El proceso de congelación de los espermatozoides produce cambios en la morfología espermática, incluyendo daño en las mitocondrias, el acrosoma y la cola, además, la criopreservación causa rotura de la membrana plasmática en la cabeza y regiones de la cola del espermatozoide (Oliva *et al*, 2010).

### **Preservación de la fertilidad masculina.**

La preservación de la fertilidad es un campo emergente que se ocupa de la investigación de este tema a través de una variedad establecida de opciones terapéuticas. Se menciona que:

- La criopreservación de espermatozoides es la más fiable opción para la preservación de la fertilidad en pacientes varones adultos. La congelación de espermatozoides con el plasma seminal parece ofrecer protección contra la lesión criogénica (Holoch, 2011).
- Los efectos protectores de blindaje de los testículos de un campo de radiación son bien conocidos. La protección gonadal a través de la supresión hormonal se basa en el principio de que la interrupción de la gametogénesis hace que la gónada sea menos sensible al efecto de los fármacos citotóxicos y irradiación. La proliferación de las células germinales en el varón podría ser inactivada por hormonas, puede ser que sean menos vulnerables a los tratamientos citotóxicos. Por desgracia, todos los intentos de desarrollar una estrategia exitosa de protección gonadal han fracasado en los seres humanos (Jahnukainen *et al*, 2011).
- La obtención de espermatozoides de niños post-adolescencia, adolescentes jóvenes y algunos adultos es problemática. Restricciones religiosas pueden impedir la masturbación en poblaciones ortodoxas, judías y otros. Se han obtenido y criopreservado espermatozoides móviles en niños de 13 a 16 años de edad mediante masturbación, estimulación vibratoria del pene (PVS), electro-

eyaculación (EEJ) y aspiración de espermatozoides testiculares (TESE) (Revel *et al*, 2008).

- Dado que los niños prepúberes no pueden beneficiarse de los bancos de semen, una estrategia alternativa potencial para preservar su fertilidad implica la criopreservación de tejido testicular inmaduro. Lo mismo se aplica también a espermatogonias de los hombres adolescentes y adultos, que pueden ser azoospermicos. El almacenamiento adecuado de tejido gonadal y cantidad óptima de material recogido son los factores que garantizan el éxito de la preservación de la fertilidad futura de células germinales y el trasplante de tejido testicular. Los protocolos de congelación optimizados son factores clave para garantizar la supervivencia de las espermatogonias. Se puede criopreservar tejido testicular como una suspensión celular o en forma de tejido. Las suspensiones celulares se consideran como más fácil de criopreservar pero la preparación de la suspensión requiere digestión mecánica o enzimática de tejido, lo que puede comprometer la supervivencia de la célula (Jahnukainen *et al*, 2011).
- Los espermatozoides podrían ser generados a partir de células madre de espermatogonias a través de diferenciación *in vitro*. Alternativamente, las células germinales podrían potencialmente ser derivadas a partir de células madre embrionarias. Las células madre de línea germinal humana para adultos han sido derivadas con éxito a partir de células testiculares de espermatogonias. Ha sido desarrollado un sistema de cultivo de agar blando en tres dimensiones que permite la diferenciación *in vitro* de células madre de espermatogonias en espermatozoides postmeioticos. Se requieren estudios para determinar si los espermatozoides generados *in vitro* mantienen la integridad del ADN o si sufren cambios sutiles epigenéticos, que podrían tener implicaciones a largo plazo para la salud de cualquier descendencia resultante, o incluso en las generaciones posteriores (Holoach *et al*, 2011).

El incremento del número de pacientes que desean mantener su fertilidad, ya sea por motivos oncológicos o de fertilidad, como son los pacientes con enfermedades infecciosas

virales transmitidas por vía sexual, o que se someten en forma voluntaria a la esterilización quirúrgica, requieren de métodos de congelación que preserven en forma adecuada la función de los espermatozoides (Berrios *et al*, 2011).

### **Banco de semen**

En sentido estricto, el banco de semen es un contenedor especialmente acondicionado para mantener muestras congeladas de distintos donantes de semen a una temperatura de 196 grados bajo cero, en nitrógeno líquido, aunque también suele describirse como banco de semen a aquellos centros donde recogen y preparan las muestras que después pasarán al contenedor (Guijarro, 2010).

El banco de semen es un servicio al que pueden recurrir aquellos hombres que por un motivo u otro deseen conservar sus gametos, ya sea como parte de un tratamiento de reproducción, como seguro de fertilidad o bien para cederlo a otras parejas. Este gran contenedor permite conservar muestras de esperma para hacer uso de ellas en el momento oportuno sin que pierdan por ello la calidad con la que fueron congeladas. Un banco de semen puede almacenar desde 800 muestras hasta más de 12.000, dependiendo del tamaño del tanque, y en ellos permanecen criopreservadas (INVIDA-IVI, 2013).

Los bancos de semen obtienen sus muestras de voluntarios sanos, mayores de edad (la mayoría de ellos estudiantes universitarios), que pasan una multiplicidad de controles para ser aceptados, ya que tienen que demostrar un perfecto estado de salud y de calidad espermática. Después de ser aceptados, se someten a controles cada tres meses para evitar el riesgo de transmisión de enfermedades sexuales. El semen sólo puede utilizarse tras demostrarse dos controles negativos, esto es, a los seis meses de almacenadas las dosis de semen (Guijarro, 2010).

El trabajo con un banco de semen en un laboratorio de andrología comprendido en un centro de reproducción va a incluir desde aspectos científicos, como podría ser la adecuada congelación de las muestras, su mantenimiento y descongelación: hasta aspectos meramente administrativos, como la correcta identificación y ubicación de las

muestras, los registros necesarios, y la gestión de altas y bajas, tanto en el caso del banco de pacientes como en el de donantes, y en este último caso en concreto, el control sobre las analíticas periódicas contempladas por la ley a la que esta población debe estar sometida, y la diferenciación entre muestras utilizables o no (Meseguer *et al*, 2002).

El banco de semen permite, además, el transporte a otras zonas geográficas (muestras valiosas, como las obtenidas antes de tratamientos de quimioterapia o biopsias) y mejora el aprovechamiento del eyaculado, ya que al congelarse las muestras en píldoras, un único eyaculado o biopsia puede unirse en diferentes ocasiones (Garrido *et al*, 2008).

## Planteamiento del problema

---

La infertilidad es un problema social que va incrementando debido a innumerables causas entre las que destacan los factores ambientales, malos hábitos alimenticios, tóxicos a los cuales está expuesto el individuo, anomalías genéticas y la edad entre otras. En la actualidad es común que las parejas que se enfrentan a problemas de fertilidad recurran a alternativas como la utilización de semen de donantes con alto potencial fertilizante.

Para esto, los bancos de semen de las clínicas de reproducción asistida recolectan semen de voluntarios jóvenes, que pasan por los debidos controles de calidad y muestran perfectas condiciones seminales, además de un excelente estado de salud. Las muestras que superan dichas pruebas son congeladas mediante técnicas de criopreservación, lo que permite su mantenimiento por largos periodos de tiempo hasta su utilización en procedimientos de reproducción asistida.

Sin embargo, en los últimos tiempos ha cobrado interés particular los daños ocasionados a los gametos masculinos generados por los diferentes procesos de criopreservación y descongelación, debido a que es indispensable la transferencia de ADN íntegro del espermatozoide al gameto femenino para lograr la fertilización y desarrollo embrionario posterior normal.

En diversos estudios se ha mostrado que el ADN dañado de espermatozoides puede afectar el desarrollo normal del embarazo y la salud del feto o embrión, es por eso que se plantea evaluar los daños que se presentan en el gameto masculino durante la criopreservación espermática.



En los últimos años se ha incrementado el número de parejas con problemas para concebir un embarazo. Es cada vez más frecuente el uso de técnicas de criopreservación para preservar la viabilidad de ambos gametos, por lo cual, es de vital importancia la conservación de la calidad de los gametos, en especial del gameto masculino. Debido a la importancia que tiene la criopreservación de espermatozoides para la utilización futura en procedimientos de reproducción asistida, el estudio se centró en evaluar los daños al ADN del espermatozoide (índice de fragmentación espermática) y la muerte celular programada (apoptosis) ocasionados por las técnicas de congelación rápida y convencional.

El semen de donantes de banco tiene una calidad comprobada mediante la evaluación de los parámetros seminales, sin embargo, para su utilización en clínicas de reproducción asistida es necesario pasar por procesos de criopreservación, estos procesos son de diversa naturaleza que dependen del tiempo y técnica de congelación, sin embargo, ocasionan daño espermático. A pesar del daño, al congelar muestras de donantes de semen y pacientes infértiles por la técnica de congelación rápida afectará en menor grado la viabilidad espermática, fragmentación de ADN y apoptosis celular, en comparación con la técnica convencional.

## Objetivo General

- Analizar el daño espermático inducido por las técnicas de congelación rápida y convencional en muestras de donantes de banco de semen y pacientes infértiles.

## Objetivos Particulares

- Evaluar las diferencias en la calidad seminal post descongelación de las técnicas de congelación convencional y rápida.
- Determinar el grado de fragmentación espermático mediante el índice de dispersión de la cromatina (SCD) y del ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA) en muestras descongeladas.
- Analizar el grado de apoptosis como resultado de la congelación de semen por las técnicas de congelación rápida y convencional.

### 1) Obtención de muestras

Se utilizaron muestras de semen de donantes y pacientes las cuales se obtuvieron por masturbación después de un periodo de abstinencia de 3 a 5 días. Se congelaron en el laboratorio de andrología de la Clínica de Reproducción Asistida HISPAREP del Hospital Español,

En la clínica se realizaron los análisis seminales (seminograma) para lo cual se mantuvo la muestra a 37 °C de temperatura. Se realizó el análisis macroscopico y microscopico.

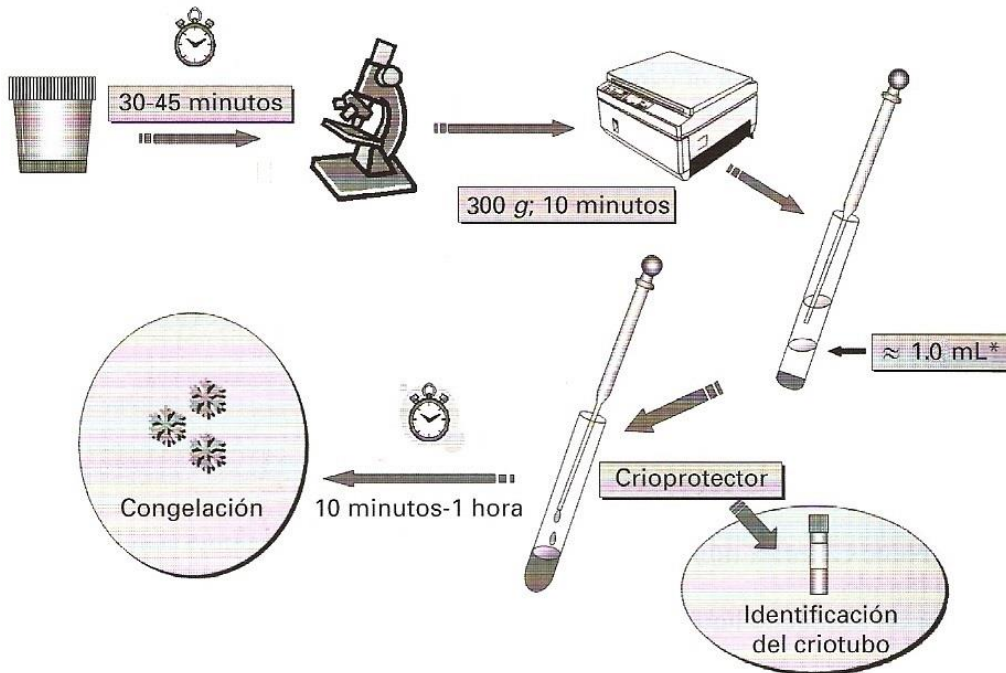
La aprobación para la utilización de muestras de pacientes infértiles fue otorgada por el comité de ética de la clínica de Reproducción Asistida HISPAREP del Hospital Español.

- **Análisis macroscópico:**
  - **Licuefacción y viscosidad:** El tiempo de licuefacción fue de 30 a 60 minutos. Si trascurridos 60 minutos la muestra no completó la licuefacción, se licuó mecánicamente, haciéndola pasar por una pipeta las veces que fuese necesario. La viscosidad se evaluó mediante una aspiración en una pipeta y observando el modo en que el semen gotea. La viscosidad se consideró normal si el semen cayó gota a gota. Para romper la viscosidad se procedió de la misma manera que para licuar la muestra.
  - **Aspecto:** El aspecto se valoró por su color (blanquecino amarillento), opacidad/transparencia y presencia de cuerpos mucosos o gelatinosos.
  - **Volumen:** El volumen se midió por absorción con pipeta graduada.
  - **pH:** El pH se midió con tiras de papel ColorpHast de Merck (Dermstadt, Alemania), con rango de sensibilidad de 6.4 a 8.0. Se colocó sobre la tira de papel una gota de semen; al cabo de 6 segundos, el color de la zona impregnada se observó uniforme y se comparó con la tira de calibración para leer el pH.

- **Análisis microscópico:** Todas las pruebas para el análisis de semen se realizaron en una campana de flujo laminar (IVF Workstation L125), hasta su análisis en el microscopio.
  - **Concentración:** Se utilizó una cámara Mackler (Sefi Medical Instrument; Haifa, Israel) que consta de un cuadrícula de 1 mm<sup>2</sup>, dividida en 100 cuadros, con una profundidad de 10 µl. Se contó una hilera de diez cuadros al azar. Estos cuadros corresponden a una concentración de millones/ml observada en objetivo 20x en contraste de fases.
  - **Movilidad:** Este análisis se realizó con cámara Mackler bajo microscopio con un objetivo de 20x en contraste de fases. Se contaron 100 espermatozoides libres por duplicado, distinguiendo entre espermatozoides móviles progresivos, móviles no progresivos e inmóviles.
  - **Viabilidad:** Se preparó una solución de eosina al 5% en solución salina de cloruro al 9%. Se mezcló 5 µl de semen y 5 µl de solución de eosina en un portaobjetos, al cual se le colocó un cubreobjetos de 22 x 22 mm para observar la preparación en objetivo de 40x. Los espermatozoides fueron contados como no teñidos (vivos) y teñidos (muertos) expresado en porcentaje. Se contaron 100 espermatozoides por duplicado.
  - **Morfología:** Las características morfológicas se evaluaron en extensiones teñidas con EspermaForm. Se preparó una extensión con 10 µl de semen y se secó. Posteriormente se utilizó la solución fijadora durante 3 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente. Se introdujo el frotis en el colorante A por 3 minutos y se dejó secar. Después se colocó el frotis en el colorante B por 5 minutos y se lavó con agua destilada con una piseta y por último se secó a temperatura ambiente. Se contaron 200 espermatozoides por duplicado con un objetivo de 100x y aceite de inmersión. Para la evaluación

se utilizaron los criterios estrictos de Kruger indicados en el manual de la OMS (2010).

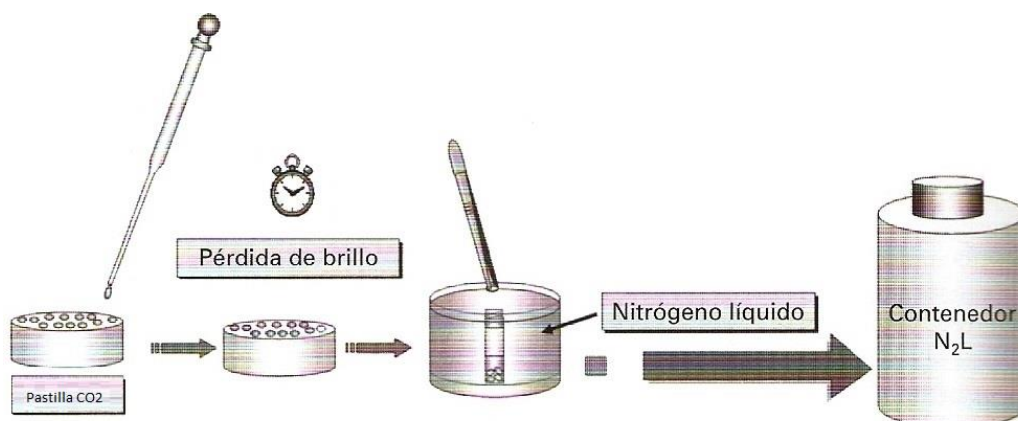
**Métodos de congelación.** Tras la colecta en un recipiente estéril se dejó la muestra de 30 a 45 minutos hasta su completa licuefacción, se realizó el análisis básico de semen, se centrifugó a 300 g por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante hasta dejar el botón celular diluido en un volumen de plasma de aproximadamente 1 ml. Se añadió el crioprotector penetrante y no penetrante TYB (Irvine Scientific; California, EUA), en proporción 1:1 y se colocó a temperatura ambiente por 25 minutos para posteriormente iniciar el proceso de congelación por técnica rápida y convencional (Figura 20).



**Figura 20. Preparación de la muestra y adición del crioprotector (Tomada y modificada de Campos et al, 2008)**

- Congelación rápida: En primer lugar, sobre una pastilla de hielo seco se excavaron pequeños pocillos de aproximadamente 5 mm de diámetro y 5 de profundidad. Posteriormente, utilizando una pipeta Pasteur, se depositaron pequeñas cantidades de la mezcla semen-crioprotector sobre los pocillos para formar píldoras. Cuando las gotas perdieron el brillo y adquirieron un color perla

opalescente se tomaron como listas para depositarlas dentro del criotubo/gobelete, el cual previamente fue introducido en un recipiente con nitrógeno líquido. El tubo, perfectamente identificado, se introdujo directamente en el tanque de nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  donde se almacenó hasta el momento de la descongelación (Figura 21).



**Figura 21. Congelación en píldoras, envasado y almacenamiento (Tomada y modificada de Campos et al, 2008)**

- Congelación convencional: En este método, se tomaron 0.4 ml de semen y se añadieron 0.4 ml de crioprotector penetrante y no penetrante TYB (Irvine Scientific; California, EUA), se homogenizó la muestra y se colocó en un criotubo eppendorff de 1 ml, la muestra se colocó en un termo criogénico con vapores de nitrógeno líquido durante 12 h, una vez transcurrido ese tiempo, la muestra de semen se sumergió directamente en el tanque de nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  donde se almacenó hasta el momento de la descongelación.

**Nota:** Los análisis seminales, la congelación de las muestras, la fragmentación por SCD en fresco y al descongelado por ambas técnicas de congelación se realizaron en el laboratorio de andrología de la Clínica de Reproducción Asistida HISPAREP.

### 2) Protocolo de fragmentación espermática por SCD

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 microgel de agarosa.** Se tomó un frasco con solución de lisis a temperatura ambiente (22° C). La muestra de semen se diluyó con medio HTF (EDTA, glutamina, gentamicina y albúmina humana 5%), a una concentración de 5 a 10 millones/ml. El tubo Eppendorf de agarosa con bajo punto de fusión se introdujo en un flotador y se dejó al nivel de la tapa, se mantuvo durante 5 minutos en agua a 96 °C, posteriormente se mantuvo durante 5 minutos en agua a 37 °C hasta equilibrar la temperatura. Se añadieron 30 µl de la muestra de semen al contenido del tubo con agarosa y se resuspendió. Un portaobjetos pretratado con agarosa se colocó en una superficie fría a 4 °C (por ejemplo, una lámina metálica o de vidrio). Una vez enfriado el portaobjetos, se depositó la suspensión celular del tubo de agarosa sobre la cara tratada del portaobjetos, se colocó un cubreobjetos de cristal, evitando formar burbujas de aire. Se colocó una gota de 14, 20 ó 50 µl, para un cubreobjetos de 18x18 mm, 22x22 mm ó 24x60 mm respectivamente. A lo largo de todo el proceso, el portaobjetos se mantuvo en posición horizontal. Se introdujo la lámina fría con el portaobjetos en la nevera y se dejó gelificar la muestra durante 5 minutos.
- **Procesado de la muestra.** Se preparó la solución desnaturalizante posteriormente a la preparación de la laminilla con el gel de agarosa. Para ello, se añadieron 80 µl de ácido desnaturalizante en 10 ml de agua destilada, se mezcló y depositó en una caja de incubación. Se retiró el cubreobjetos, deslizándolo con suavidad y se introdujo inmediatamente el portaobjetos en posición horizontal en la solución desnaturalizante para dejar incubando durante 7 minutos a temperatura ambiente (22 ° C). Usando guantes, se levantó el portaobjetos con ayuda de una lanceta. Se depositó también en horizontal, en una caja de incubación conteniendo 10 ml de



solución de lisis, dejándolo durante 25 minutos. Se levantó el portaobjetos y se introdujo en horizontal en una caja llena de agua destilada para lavar la solución de lisis, con un tiempo de lavado de 5 minutos. Posteriormente se introdujo el portaobjetos en horizontal en una caja con etanol al 70% (2 minutos), luego en etanol al 90% (2 minutos) y finalmente en etanol al 100% (2 minutos). Se dejó secar al aire. Una vez secos los portaobjetos se procede a la tinción.

- **Tinción de la muestra.** Se mezcló solución de Wright (Merck; Dermstadt, Alemania) con solución tampón fosfato (1:1) pH 6.68 (Merck; Dermstadt, Alemania) y se depositó una capa de colorante, en horizontal, que cubrió el microgel seco. Se dejó tiñiendo durante 5 a 10 minutos, para posteriormente ser decantado y lavado suavemente con agua corriente y se dejó secar.
- Se contaron 500 espermatozoides por duplicado en microscopio de campo claro con objetivo de inmersión y se calculó el porcentaje (Diagrama 1).

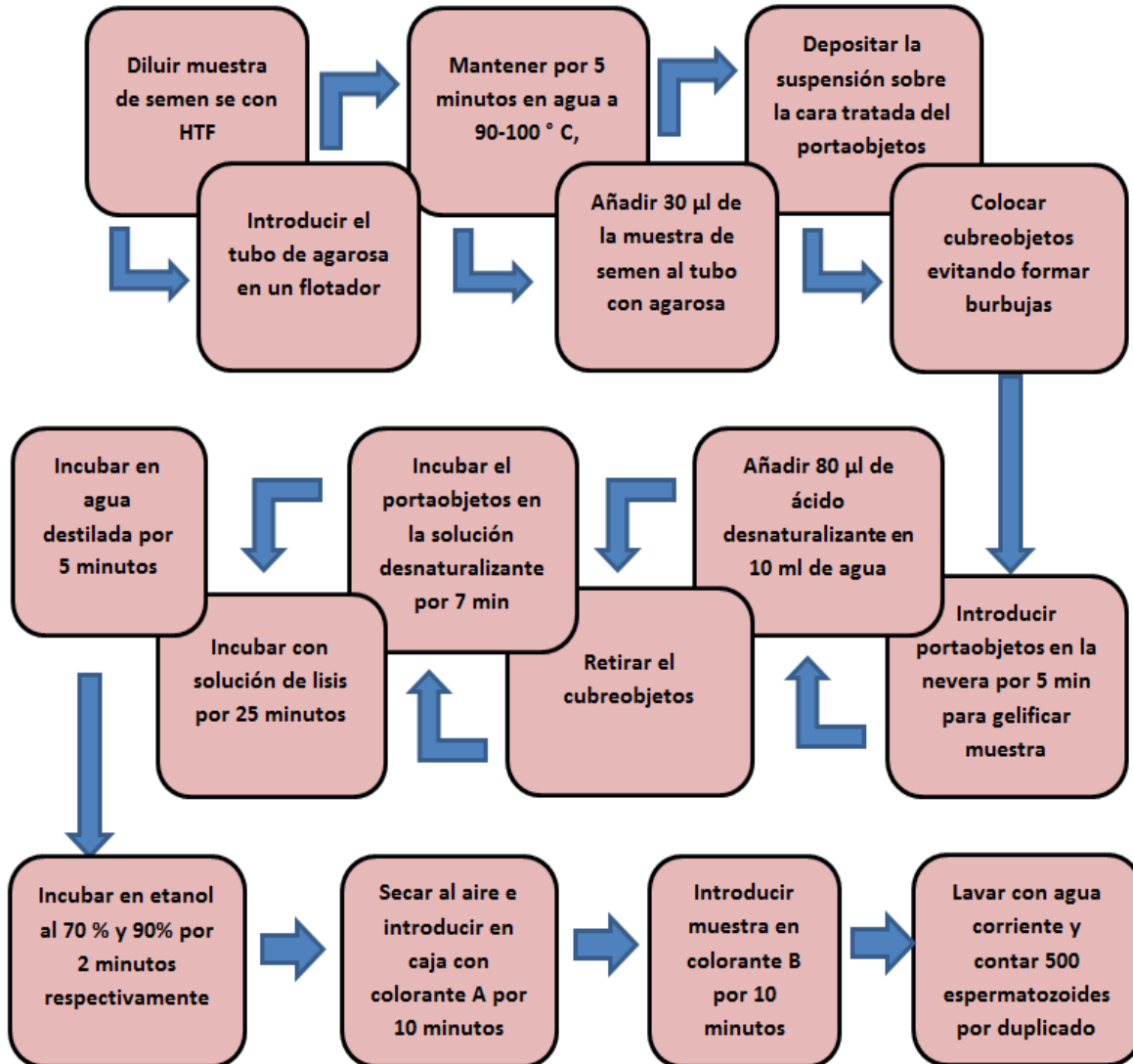


Diagrama 1. Protocolo de evaluación de fragmentación de ADN por técnica SCD (Tomado de Halosperm, 2005).

### 3) Transporte de muestras

La fragmentación espermática por SCSA y apoptosis se realizó en el laboratorio de inmunobiología del Hospital Juárez de México, por lo cual se transportaron las muestras seminales desde la clínica HISPAREP. Para esto se utilizó un termo isotérmico de acero inoxidable que almacenó las muestras de semen (viales y gobeletes) sumergidos en nitrógeno líquido. El transporte se realizó en el menor tiempo posible para evitar la evaporación total del nitrógeno y por consiguiente la descongelación de las muestras. Una

vez que las muestras se encontraron en el hospital Juárez inmediatamente se colocaron en el ultracongelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  de temperatura hasta su uso.

#### 4) Descongelación de muestras

Se colocó la muestra (una pildora en caso de ser muestra congelada por técnica rápida o todo el vial en los casos de muestras congeladas por técnica convencional) por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente en un baño de agua o incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Se realizó el conteo mediante la cámara Makler para así obtener la cantidad de muestra a utilizar en cada protocolo (Figura 22).

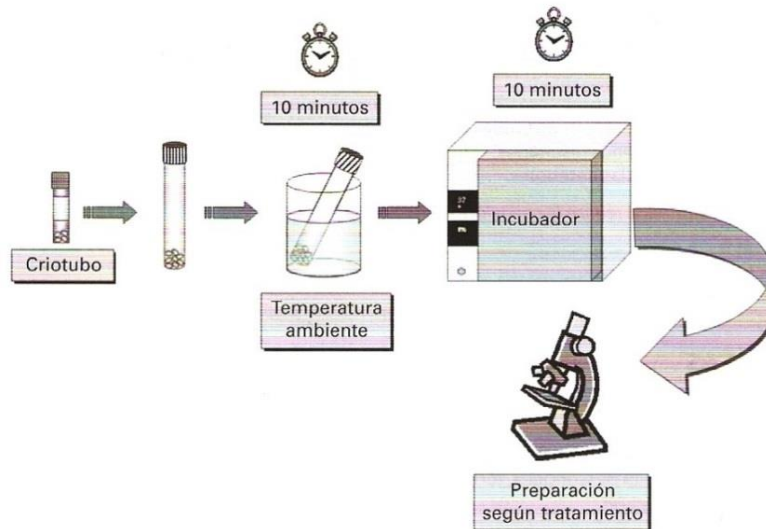


Figura 22. Proceso de descongelación (Tomada y modificada de Campos *et al*, 2008)

#### 5) Protocolo Apoptosis

Una vez obtenida la concentración espermática se diluyó la muestra ( $20\ \mu\text{l}$ ) en  $380\ \mu\text{l}$  de buffer HTF (EDTA, glutamina, gentamicina y albúmina humana 5%). Se colocaron 500,000 células a dos tubos eppendorf y se le agregaron  $500\ \mu\text{l}$  de buffer Binding (buffer frío) a cada tubo, se centrifugó a 300 g por 5 minutos y se decantó, se agregaron nuevamente  $500\ \mu\text{l}$  de buffer frío y se procedió a colocar fluorocromos. Para esto se colocaron  $100\ \mu\text{l}$  de solución a dos tubos eppendorf (un tubo para muestra a estudiar y uno para control). Al tubo con la muestra a estudiar se agregó  $1\ \mu\text{l}$  de 7-AAD (7- amino-actinomycin-D) y  $1\ \mu\text{l}$  de

Anexina V (PE). Al tubo con la muestra control no se le agregaron fluorocromos. Se incubaron ambos tubos eppendorf por 15 minutos a 4 ° C en oscuridad. Se leyeron 10,000 células en citómetro de flujo Accuri C6 previamente lavado (Diagrama 2).

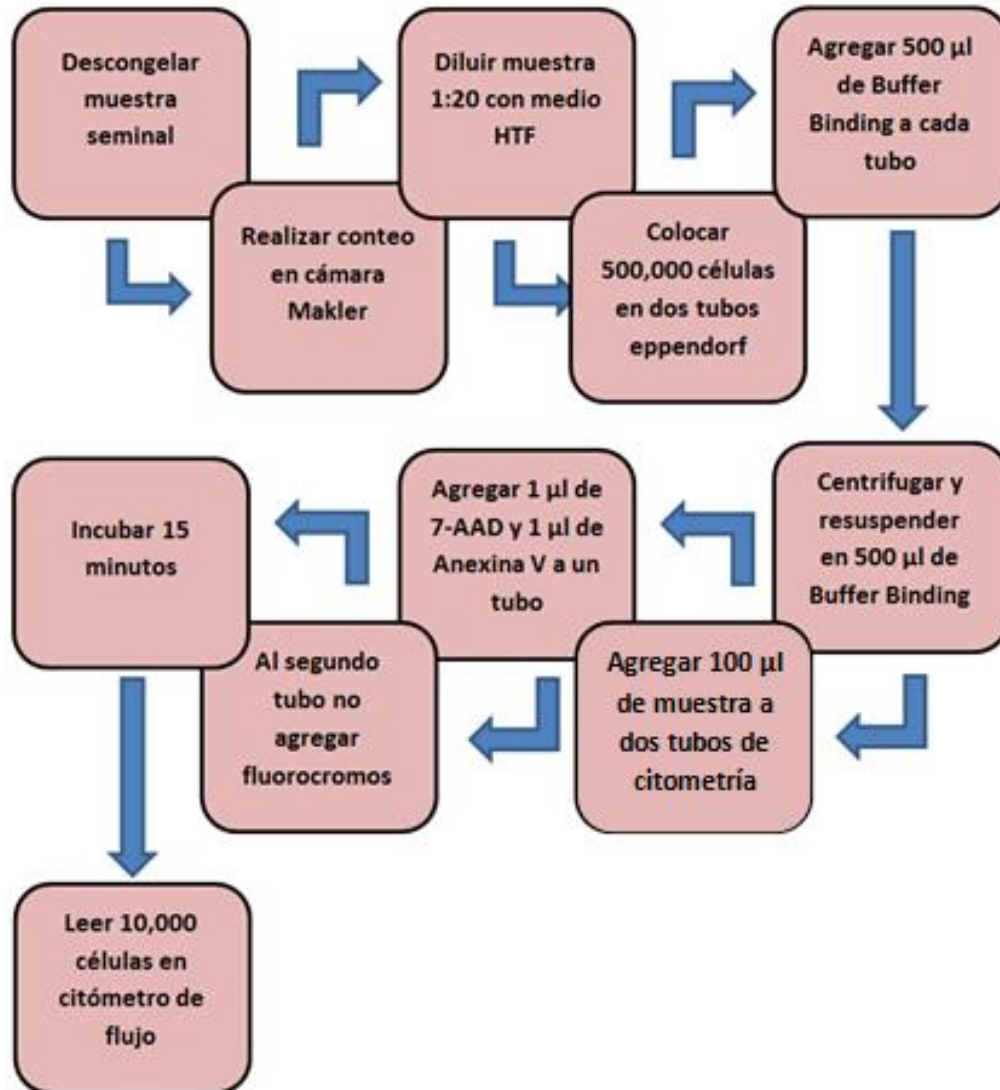


Diagrama 2. Protocolo de evaluación de apoptosis (Tomado y modificado de BD Biosciences, 2008; BD Biosciences. (2011).

### 6) Protocolo de fragmentación espermática por SCSA

Una vez obtenida la concentración espermática se diluyó la muestra (20 µl) en 380 µl de buffer HTF (EDTA, glutamina, gentamicina y albúmina humana 5%). Se colocaron 500,000 células en un tubo eppendorf y se suspendieron en 500 µl de TNE buffer (EDTA, TRIS y

NaCl, pH 7.4) y se colocó en hielo hasta su tinción. En dos tubos eppendorf (uno para muestra a estudiar y una para muestra control) se colocaron 200  $\mu$ l de la muestra y 400  $\mu$ l de solución lítica (Triton X-100, HCL y NaCl, pH 1.4 a 4 ° C) a cada tubo. Se incubó por 30 segundos e inmediatamente se agregaron 10  $\mu$ l de solución de acridina (ácido cítrico, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, EDTA, NaCl y Naranja de Acridina, pH 6.0). Se Incubó por 3 minutos a 4 ° C en oscuridad. Se leyeron 10,000 células en citómetro de flujo Accuri C6 previamente lavado (Diagrama 3).

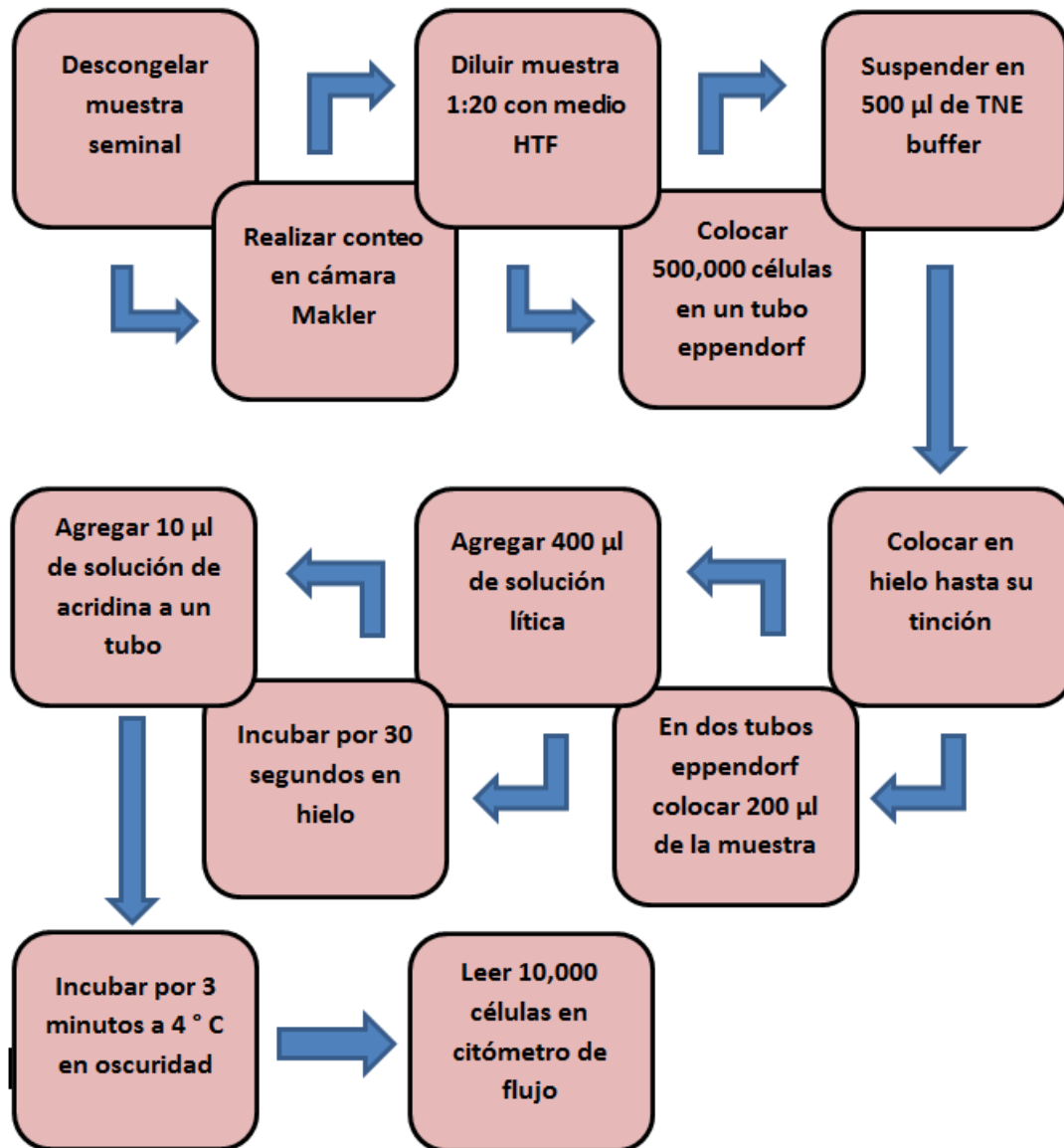


Diagrama 3. Protocolo de evaluación de fragmentación de ADN por técnica SCSA (Tomado de Evenson, 2013).

### Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 6.00 para evaluar las diferencias entre las variables estudiadas.

Para comparar los parámetros de morfología, concentración, movilidad, apoptosis y las diferencias en la fragmentación de ADN por las técnicas de congelación, así como los métodos de evaluación de DFI se utilizó la prueba t de muestras no pareadas.

Se tomó un valor de significancia de  $p < 0.05$ .

## Resultados

- **Grupo de estudio**

Se analizaron 36 muestras de semen provenientes del laboratorio de andrología de la Clínica de reproducción asistida HISPAREP del Hospital español. De estas muestras, se diferenciaron 4 grupos de estudio:

- 14 muestras de donantes criopreservadas por método convencional.
- 14 muestras de donantes criopreservadas por método rápido.
- 4 muestras de pacientes infértiles criopreservadas por método convencional.
- 4 muestras de pacientes infértiles criopreservadas por método rápido.

### Estudio I. Análisis seminal

- ✓ **Concentración** (Pacientes vs donantes). Se comparó la concentración de espermatozoides entre donantes y pacientes (Tabla 5).

**Tabla 5. Concentración espermática (media ± D.E.) de pacientes vs donantes. Muestras en fresco, con descongelación de técnica convencional y rápida.**

	A		B		p
	n	Donantes (1 x 10 <sup>6</sup> )	n	Pacientes (1 x 10 <sup>6</sup> )	
<b>Fresco</b>	14	70.43 ± 12.84	4	41.75 ± 16.88	0.0020
<b>Descongelación- Técnica convencional</b>	14	59.50 ± 17.02	4	38.50 ± 19.54	NS
<b>Descongelación- Técnica rápida</b>	14	63.43 ± 18.60	4	38.25 ± 20.48	0.0325

En la tabla 5 se observan diferencias estadísticamente significativas en las muestras evaluadas en fresco, la concentración espermática en pacientes es significativamente menor que en donantes. Cuando se criopreservaron por técnica convencional no resulto diferencia significativa, mientras que mediante la técnica de congelación rápida nuevamente la concentración de pacientes fue menor que la de donantes.

- ✓ **Morfología** (Pacientes vs donantes). Se comparó el porcentaje de espermatozoides con morfología normal entre donantes y pacientes (Tabla 6).

**Tabla 6. Espermatozoides normales (media  $\pm$  D.E.) de pacientes vs donantes. Muestras en fresco, con descongelación de técnica convencional y rápida.**

	A		B		p
	n	Donantes (%)	n	Pacientes (%)	
<b>Fresco</b>	14	09.50 $\pm$ 01.22	4	02.80 $\pm$ 00.96	< 0.0001
<b>Descongelación- Técnica Convencional</b>	14	06.90 $\pm$ 01.21	4	01.50 $\pm$ 00.60	< 0.0001
<b>Descongelación- Técnica rápida</b>	14	08.70 $\pm$ 01.16	4	02.00 $\pm$ 00.80	< 0.0001

En la tabla 6 se presentan las muestras en fresco, criopreservadas por técnica convencional y rápida tanto en pacientes como en donantes. Se observa que la morfología espermática de los pacientes es significativamente menor tanto en fresco como después de la descongelación.

- ✓ **Movilidad**

- ✓ Se comparó la movilidad progresiva en muestras de donantes y pacientes en fresco, criopreservadas por técnica convencional y rápida (Tabla 7).

**Tabla 7. Movilidad progresiva (media  $\pm$  D.E.) de pacientes vs donantes. Muestras en fresco, con descongelación de técnica convencional y rápida.**

	A		B		p
	n	Donantes (%)	n	Pacientes (%)	
<b>Fresco</b>	14	71.43 $\pm$ 08.29	4	37.25 $\pm$ 12.92	< 0.0001
<b>Descongelación- Técnica Convencional</b>	14	30.57 $\pm$ 05.65	4	24.75 $\pm$ 09.54	NS
<b>Descongelación- Técnica rápida</b>	14	39.29 $\pm$ 09.23	4	25.25 $\pm$ 06.29	0.0121

Se observa en la tabla 7 que la movilidad progresiva es significativamente menor en muestras procedentes de pacientes que de donantes analizadas en fresco. Posterior a la criopreservación, las muestras de donantes se afectaron considerablemente, sin embargo, resultó mayor el número de espermatozoides móviles usando la técnica rápida. El método de criopreservación convencional no mostró diferencias significativas entre donantes y pacientes, pero sí la criopreservación rápida.



- ✓ Se comparó la movilidad no progresiva en muestras de donantes y pacientes en fresco, criopreservadas por técnica convencional y rápida (Tabla 8).

	n	A Donantes (%)	n	B Pacientes (%)	p
<b>Fresco</b>	14	11.07 $\pm$ 02.92	4	13.00 $\pm$ 05.48	NS
<b>Descongelación- Técnica Convencional</b>	14	15.43 $\pm$ 05.37	4	15.75 $\pm$ 02.06	NS
<b>Descongelación- Técnica rápida</b>	14	14.79 $\pm$ 02.78	4	15.25 $\pm$ 02.50	NS

La tabla 8 muestra que la movilidad no progresiva no se modifica o fue similar entre muestras en fresco y descongeladas tanto en pacientes como en donantes.

- ✓ Se comparó la inmovilidad espermática en muestras de donantes y pacientes en fresco, criopreservadas por técnica convencional y rápida (Tabla 9).

	n	A Donantes (%)	n	B Pacientes (%)	p
<b>Fresco</b>	14	17.50 $\pm$ 06.28	4	50.25 $\pm$ 12.58	< 0.0001
<b>Descongelación- Técnica Convencional</b>	14	54.00 $\pm$ 06.67	4	59.50 $\pm$ 10.02	NS
<b>Descongelación- Técnica rápida</b>	14	45.93 $\pm$ 09.47	4	57.00 $\pm$ 02.16	0.0370

Se observa en la tabla 9 que en muestras en fresco, la diferencia en la cantidad de espermatozoides inmóviles es estadísticamente significativa entre donantes y pacientes. Se observó que por ambas técnicas de congelación hay aumento de espermatozoides inmóviles siendo estadísticamente significativa la diferencia en la técnica rápida.

- ✓ Espermocultivo: A todas las muestras se les realizó cultivo con la finalidad de analizar microorganismos patógenos. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Resultado de espermocultivo para las muestras de donantes y pacientes

	Código	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
Donantes	GPL	Negativo	Negativo	Negativo
	DBM	Negativo	Negativo	Negativo
	ARS	Negativo	Negativo	Negativo
	MLO	Negativo	Negativo	Negativo
	OCS	Negativo	Negativo	Negativo
	FGJ	Negativo	Negativo	Negativo
	NRC	Negativo	Negativo	Negativo
	OLO	Negativo	Negativo	Negativo
	COT	Negativo	Negativo	Negativo
	EAR	Negativo	Negativo	Negativo
	JNA	Negativo	Negativo	Negativo
	AAG	Negativo	Negativo	Negativo
	AAG-024	Negativo	Negativo	Negativo
Pacientes	Blanco	Negativo	Negativo	Negativo
	FADN-135	Negativo	Negativo	Negativo
	FADN-136	Negativo	Negativo	Negativo
	FADN-137	Negativo	Negativo	Negativo
	AS122	Negativo	Negativo	Negativo

Todas las muestras resultaron negativas para infecciones de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum*.

### Estudio II. Fragmentación de ADN espermático.

En este estudio se cuantificó el grado de fragmentación de ADN espermático. Se utilizaron dos métodos, SCD o dispersión de la cromatina espermática y SCSA o ensayo de estructura de la cromatina espermática. Todas las muestras se evaluaron por los dos métodos.

Mediante el método SCD se evaluó la integridad de la cromatina espermática. Se obtuvo el índice de fragmentación (DFI) en muestras frescas y post descongeladas, criopreservadas por técnicas convencional y rápida. El método SCSA se utilizó exclusivamente en muestras descongeladas por ambas técnicas de criopreservación.

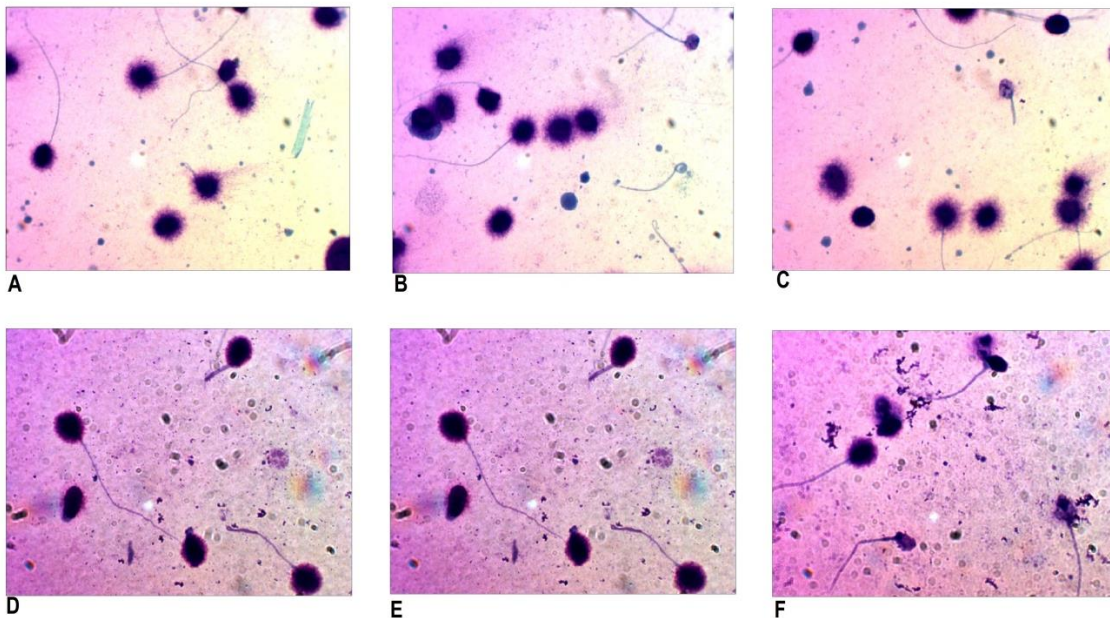
Los valores obtenidos se clasifican de acuerdo a la escala establecida por Evenson y col. (2002), en la cual determinaron cuatro categorías para el potencial fertilizante del espermatozoide según el DFI:

- Excelente si el DFI < 15%

- Alto si el DFI 15-24%
- Bajo si el DFI 25-30%
- Muy bajo si el DFI > 30%

Para obtener el porcentaje de fragmentación de ADN por el método SCD se observaron 500 células por duplicado en cada muestra. Se clasificaron según el tamaño del halo de dispersión de la cromatina, los espermatozoides que tienen su ADN fragmentado mostraron halo pequeño o se observaron sin halo. Por el contrario los que no están fragmentados presentaron grandes halos de dispersión (Figura 23).

Cuantificados los espermatozoides se calculó el DFI.



**Figura 23. Fotomicrografías de espermatozoides analizados por método SCD. A: Muestra de donante en fresco. B: Técnica rápida-Donante. C: Técnica convencional-Donante. D: Muestra de Paciente en fresco. E: Técnica rápida-Paciente. F: Técnica convencional-Paciente. Obtenidas en el laboratorio de andrología HISPAREP.**

Utilizando el método SCSA se cuantificó el daño a la cromatina espermática por el cambio de metacromática (ADN nativo, de doble cadena) verde a rojo (ADN desnaturalizado, monocatenario) de fluorescencia y se muestra como rojo vs. verde. La principal población representa los espermatozoides que emiten más fluorescencia verde que fluorescencia

roja debido a la doble hebra con configuración predominantemente normal de su ADN. Los espermatozoides situados a la derecha de esta población principal representan aquellas células que muestran un aumento de la cantidad de fluorescencia roja y una disminución de la fluorescencia verde en comparación con los espermatozoides en la población principal. Los cálculos se realizaron para cada muestra: el porcentaje de espermatozoides fuera de la principal población con ADN desnaturalizado (% DFI); el porcentaje de espermatozoides con una capacidad de tinción anormalmente alta de ADN (% HDS), por encima del borde superior de la agrupación principal de la población de espermatozoides sin desnaturalización del ADN detectable; residuos por debajo de la población principal (% debrís). Los porcentajes de estas variables se muestran en los plots obtenidos al realizar el análisis en citómetro de flujo (Figura 24).

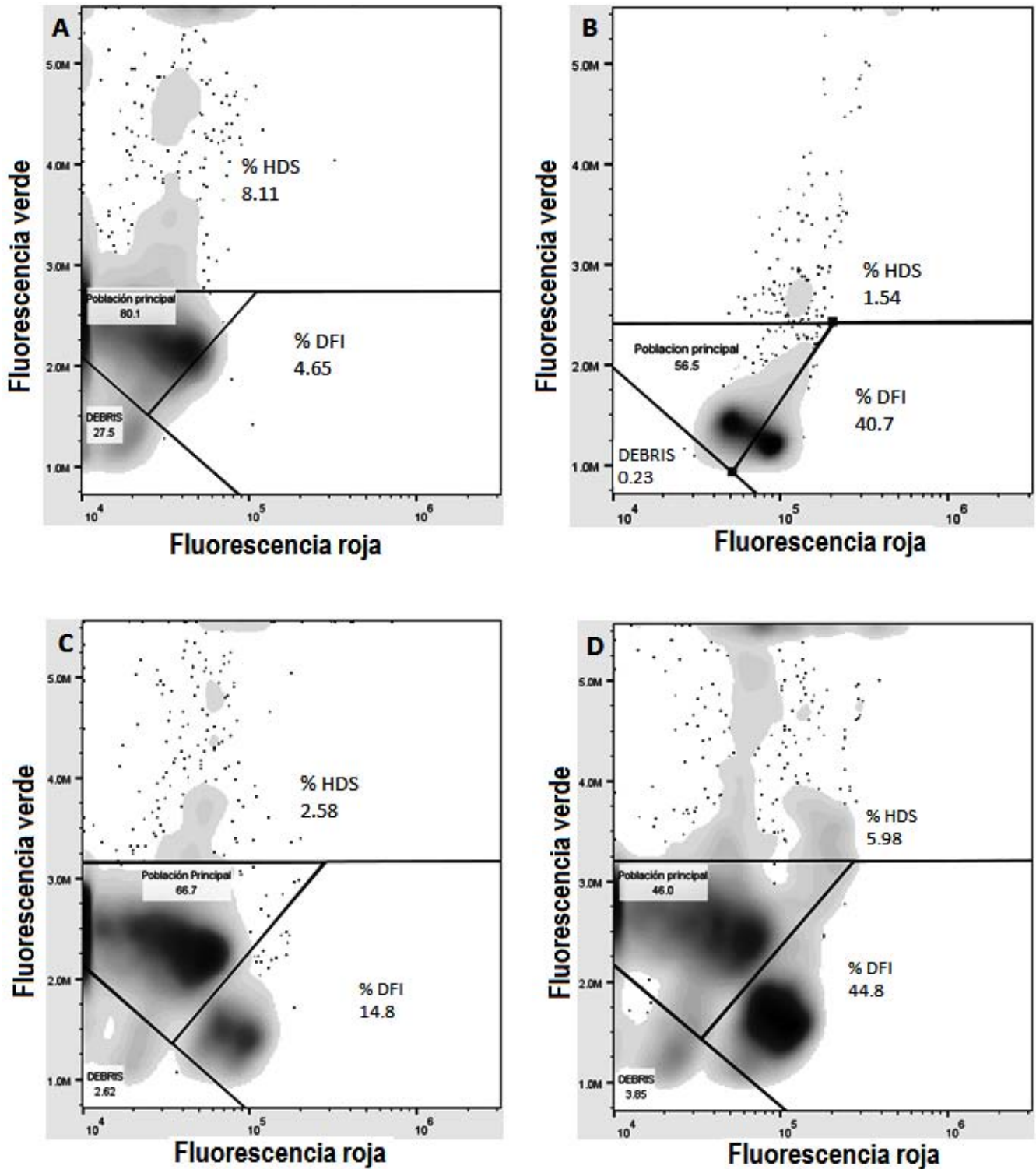


Figura 24. Plots representativos obtenidos por citómetro de flujo. A: Tinción con Naranja de Acridina Técnica rápida- Donantes. B: Tinción con Naranja de Acridina Técnica rápida-Pacientes. C: Tinción con Naranja de Acridina Técnica convencional- Donantes. D: Tinción con Naranja de Acridina Técnica convencional-Pacientes.

 Fragmentación de ADN. SCSA vs SCD

a) Los valores obtenidos para las muestras de donantes de banco de semen cuando se utilizó el método SCD se muestran en la tabla 11.

Potencial de fertilización en donantes de banco de semen obtenido por SCD									
	n	Excelente		Alto		Bajo		Muy Bajo	
		DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras
Fresco %	14	9.9	14 (100%)	0	0	0	0	0	0
Post Descongelado Técnica Rápida %	14	12.85	11 (78.57%)	15.47	3 (21.43%)	0	0	0	0
Post Descongelado Técnica Convencional %	14	0	0	20	14 (100%)	0	0	0	0

**Tabla 11. Número de muestras (%) e índice de fragmentación de ADN en fresco y post descongelado de muestras de donantes de banco de semen utilizando la técnica SCD.**

En muestras de donantes en fresco, la tabla 11 muestra que la calidad del ADN es óptima mostrando un potencial fertilizante excelente en todas las muestras analizadas. Después del proceso de congelación por técnica rápida la calidad se ve disminuida, sin embargo, el potencial fertilizante continúa siendo óptimo, encontrando valores de DFI categorizados como excelentes y altos según la clasificación de Evenson y col (2002). Cuando se criopreservó por técnica convencional no se obtuvieron valores con potencial fertilizante excelente, sin embargo, todas las muestras se clasificaron en rango potencial alto.

b) Los valores obtenidos para las muestras de pacientes infértiles cuando se utilizó el método SCD se muestran en la tabla 12.

Potencial de fertilización en pacientes infértiles obtenido por SCD

	n	Excelente		Alto		Bajo		Muy Bajo	
		DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras
Fresco %	4	0	0	24.6	1 (25%)	26.5	(50%)	34.9	1 (25%)
Post Descongelado Técnica Rápida %	4	0	0	0	0	29.2	1 (25%)	34.3	3 (75%)
Post Descongelado Técnica Convencional %	4	0	0	0	0	0	0	39.02	4 (100%)

**Tabla 12. Número de muestras (%) e índice de fragmentación de ADN en fresco y post descongelado de muestras de pacientes infértiles utilizando el método SCD.**

En muestras de pacientes infértiles en fresco (tabla 12), se observó que el potencial fertilizante es alto, bajo y muy bajo. Después del proceso de congelación por técnica rápida no se observaron muestras con alto potencial fertilizante, es decir, la calidad del ADN fue disminuida siendo categorizadas las muestras con potencial bajo y muy bajo. Sin embargo, utilizando la técnica convencional en la criopreservación de muestras de pacientes, el potencial fertilizante se afectó severamente encontrando en su totalidad las muestras con elevado DFI entrando en categoría de muestras con muy bajo potencial fertilizante.

Otro método que se utilizó para evaluar el daño al ADN fue el ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA) en muestras de pacientes infértiles y de donantes de banco de semen post descongelación criopreservadas por las técnicas de congelación rápida y convencional. Al igual que para el método SCD se utilizó la clasificación de Evenson y col. (2002) para establecer el potencial fertilizante según su índice de fragmentación de ADN.

Este análisis se realizó únicamente post descongelación, por lo cual, no se obtuvieron valores de SCSA en muestras en fresco.

- c) La tabla 13 muestra los valores obtenidos mediante SCSA para muestras de donantes de banco de semen.



	n	Excelente		Alto		Bajo		Muy Bajo	
		DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras
<b>Fresco %</b>	0	*	*	*	*	*	*	*	*
<b>Post Descongelado Técnica Rápida %</b>	14	4.77	13 (92.85%)	18.8	1 (7.15%)	0	0	0	0
<b>Post Descongelado Técnica Convencional %</b>	14	10.80	1 (7.15%)	0	0	28.6	5 (35.72%)	39.58	8 (57.14%)

**Tabla 13. Número de muestras (%) e índice de fragmentación de ADN en fresco y post descongelado de muestras de donantes de banco de semen utilizando el método SCSA. \* No se utilizó el método SCSA en muestras en fresco.**

Utilizando el método SCSA (tabla 13) se obtuvo que el daño ocasionado al ADN espermático de muestras criopreservadas por técnica rápida es bajo, es decir, presentan excelente y alto potencial fertilizante. Cuando se utilizó la técnica convencional como método de criopreservación, se encontró alto grado de daño al ADN, clasificando las muestras con bajo y muy bajo potencial fertilizante.

d) La tabla 14 muestra los valores obtenidos mediante SCSA para muestras de pacientes infértiles.

### Potencial de fertilización en pacientes infértiles obtenido por SCSA

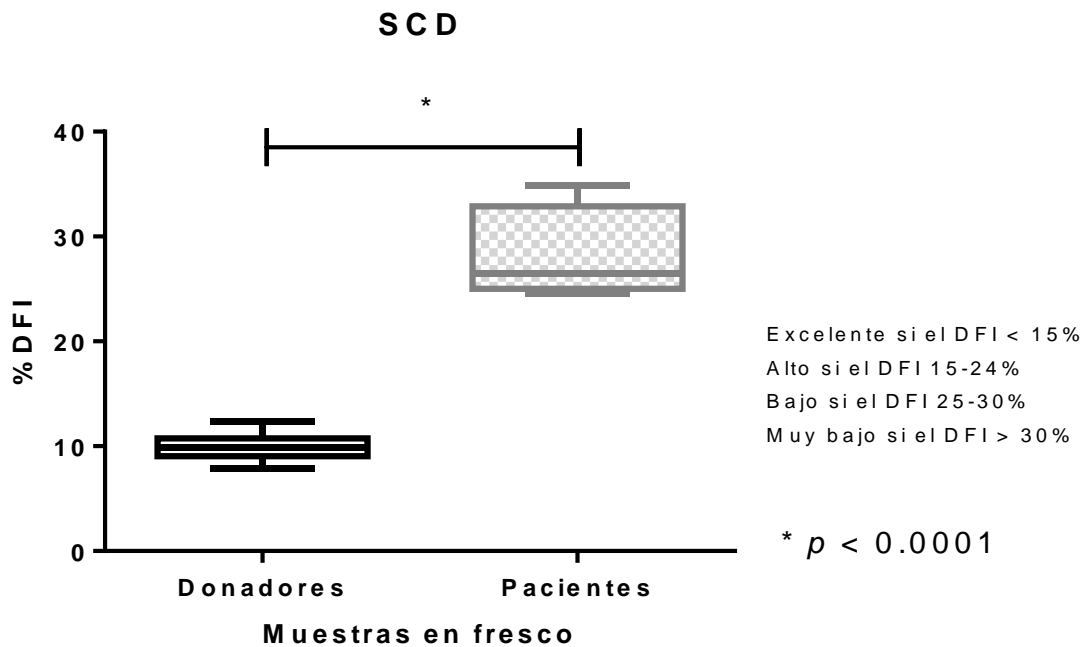
	n	Excelente		Alto		Bajo		Muy Bajo	
		DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras	DFI %	No. de muestras
<b>Fresco %</b>	0	*	*	*	*	*	*	*	*
<b>Post Descongelado Técnica Rápida %</b>	4	0	0	0	0	27.3 (50%)	2 (50%)	32.2	2 (50%)
<b>Post Descongelado Técnica Convencional %</b>	4	0	0	0	0	0	0	38.6	4 (100%)

**Tabla 14. Número de muestras (%) e índice de fragmentación de ADN en fresco y post descongelado de muestras de pacientes infértiles utilizando el método SCSA. \* No se utilizó el método SCSA en muestras en fresco.**

En muestras que proceden de pacientes (tabla 14) con algún problema de infertilidad, se evaluó la calidad del ADN por SCSA. Los resultados obtenidos post descongelación por técnica rápida mostraron que el daño al ADN es alto siendo clasificados con bajo y muy bajo potencial fertilizante. Sin embargo, se observó que sufren mayor afectación cuando se criopreservan por técnica convencional, ya que en su totalidad se categorizan con muy bajo potencial fertilizante.

- ✓ Se compararon los resultados del daño al ADN medido por SCD en muestras en fresco de Donantes de banco de semen vs Pacientes Infértiles (Gráfica 1).

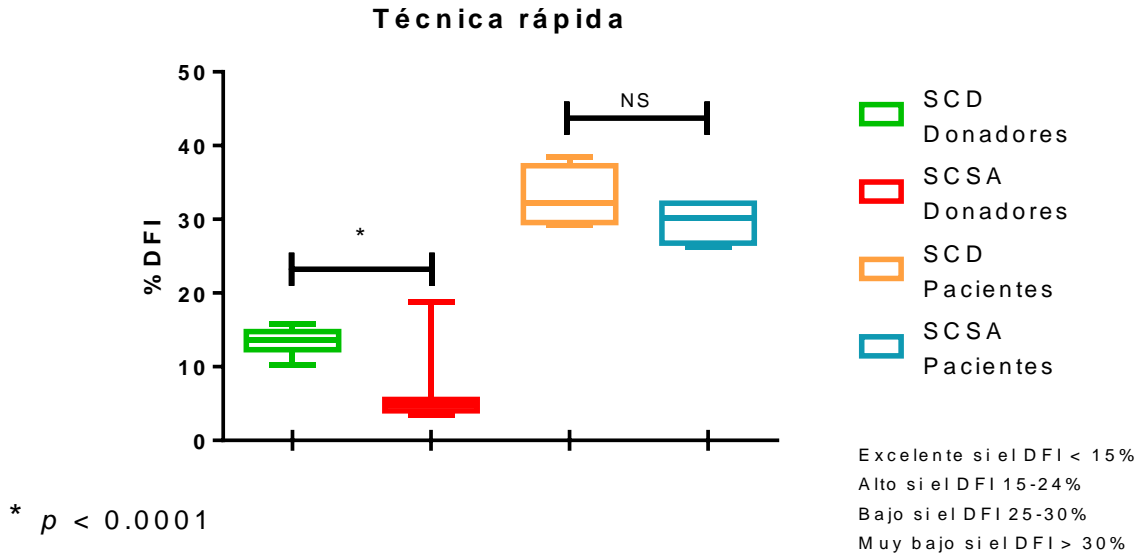




**Gráfica 1. Diferencia entre los métodos de evaluación de fragmentación de ADN en muestras de donantes criopreservadas por técnica rápida.**

Se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados. Las muestras de donantes cuando fueron evaluadas en fresco se clasificaron con excelente potencial fertilizante, mientras que las muestras de pacientes se clasificaron dentro del rango bajo y muy bajo potencial fertilizante.

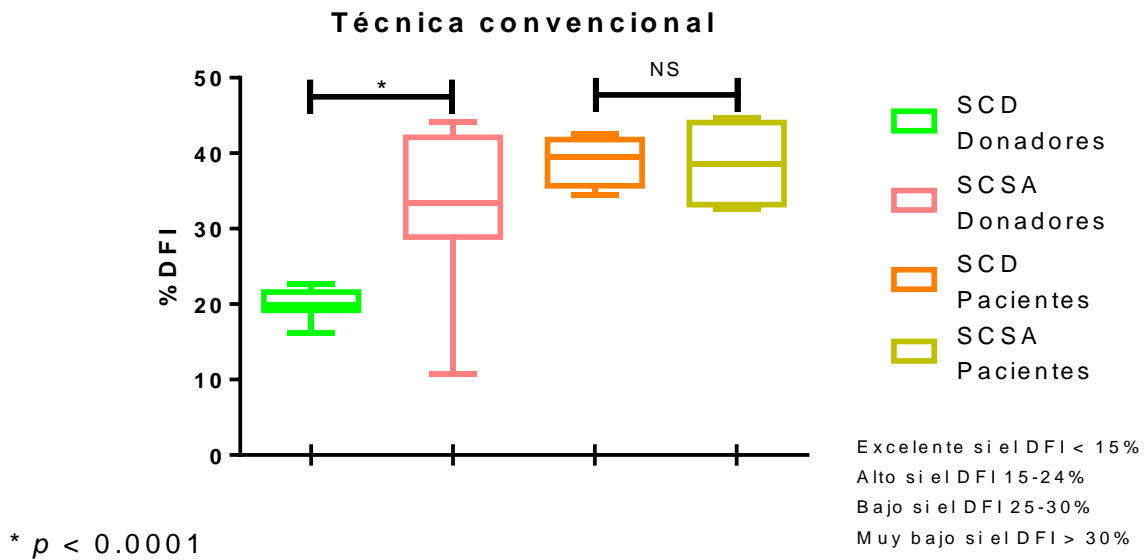
- ✓ Se compararon los resultados del daño al ADN generado como consecuencia de la técnica de congelación rápida y en muestras de donantes de banco de semen y pacientes infértiles obtenidos por los métodos SCD vs SCSA (Gráfica 2).



**Gráfica 2. Diferencia entre los métodos de evaluación de fragmentación de ADN en muestras de donantes v pacientes criopreservadas por técnica rápida.**

La diferencia entre los dos métodos de evaluación de DFI resultó estadísticamente significativa, siendo mayor cuando se evaluó por SCD. Sin embargo, a pesar de esta diferencia, ambos métodos de evaluación clasificaron las muestras de donantes con excelente potencial fertilizante. En muestras de pacientes la diferencia entre los métodos de evaluación de DFI no resultó estadísticamente significativa. Las muestras evaluadas se categorizaron en rango de bajo a muy bajo potencial fertilizante tanto en método SCD como SCSA.

- ✓ Se compararon los resultados del daño al ADN generado como consecuencia de la técnica de congelación convencional en muestras de donantes de banco de semen y pacientes infértiles obtenidos por los métodos SCD vs SCSA (Gráfica 3).



**Gráfica 3. Diferencia entre los métodos de evaluación de fragmentación de ADN en muestras de donantes v pacientes de banco de semen criopreservadas por técnica convencional.**

Resultó diferente estadísticamente significativa para los métodos de evaluación de DFI. Cuando las muestras fueron evaluadas por SCD se categorizaron en rango de potencial fertilizante alto, mientras que evaluadas por SCSA se categorizaron como bajo y muy bajo. En muestras de pacientes no hay diferencia estadísticamente significativa entre los métodos de evaluación de DFI. Esta prueba muestra que la técnica convencional afecta principalmente a las muestras seminales de pacientes, ya que en ambos métodos de evaluación de fragmentación de ADN se clasificaron las muestras con muy bajo potencial fertilizante.

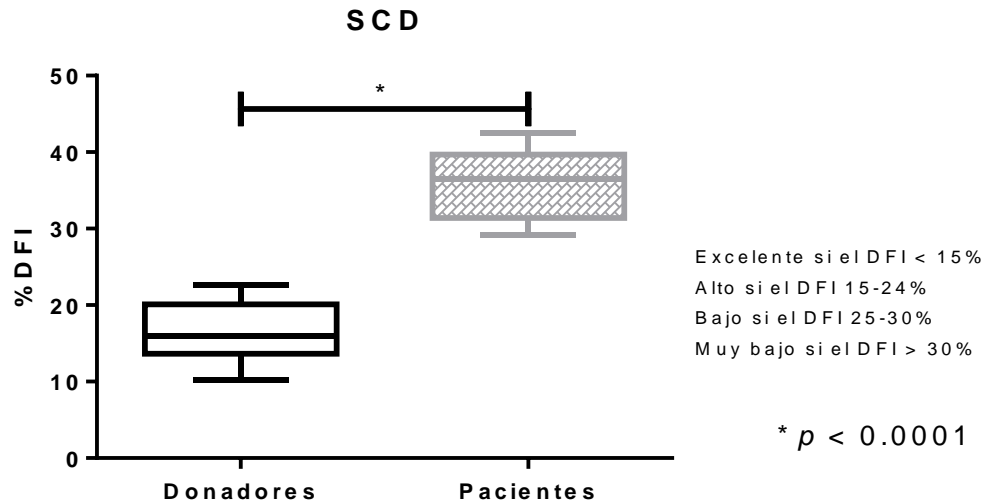
### ✓ Método SCD

Para este procedimiento se identificaron cuatro variables:

- Donantes-Técnica rápida.
- Donantes-Técnica convencional.
- Pacientes-Técnica rápida.
- Pacientes-Técnica convencional.

- ✓ Se comparó el % DFI obtenido por método SCD, en muestras de donantes de banco de semen vs pacientes infértiles (Gráfica 4).

Se obtuvo diferencia que resultó estadísticamente significativa entre donantes y pacientes.



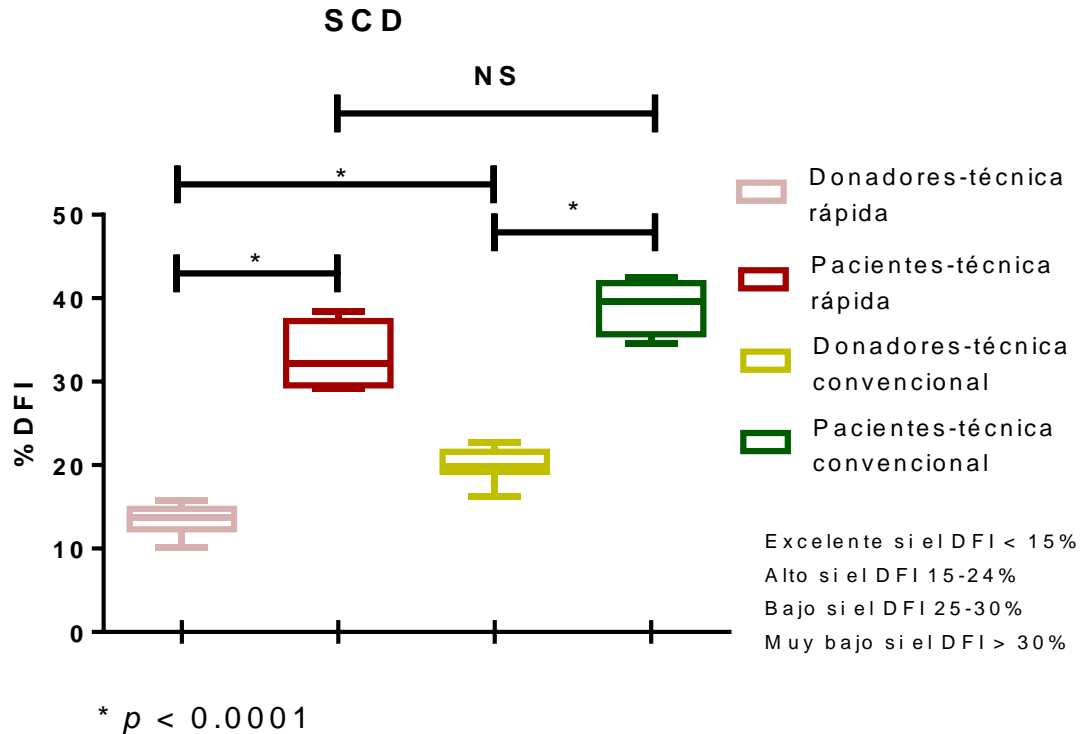
**Gráfica 4. Índice fragmentación de ADN evaluado por método SCD, en muestras de pacientes vs donantes.**

Se observa que el índice de fragmentación espermática (%) es significativamente mayor en muestras procedentes de pacientes que el índice de fragmentación de ADN de muestras de donantes de banco de semen, estos valores fueron comparados independientemente de la técnica de criopreservación. Los donantes presentan potencial fertilizante de excelente a alto, mientras que los pacientes infértiles muestran potencial fertilizante muy bajo.

En la gráfica 5 se expresan los grupos evaluados y las comparaciones realizadas que a continuación se describen.

- ✓ Se comparó el % DFI obtenido por método SCD, en muestras de donantes de banco de semen vs pacientes infértiles criopreservadas por técnica rápida (Gráfica 5).
- ✓ Se comparó el % DFI obtenido por método SCD, en muestras de donantes de banco de semen vs pacientes infértiles criopreservadas por técnica convencional (Gráfica 5).
- ✓ Se comparó el % DFI obtenido por método SCD, en muestras de donantes de banco de semen criopreservadas por técnica convencional vs muestras de donantes de banco de semen criopreservadas por técnica rápida (Gráfica 5).

- ✓ Se comparó el % DFI obtenido por método SCD, en muestras de pacientes infértiles criopreservadas por técnica convencional vs pacientes infértiles criopreservadas por técnica rápida (Gráfica 5).



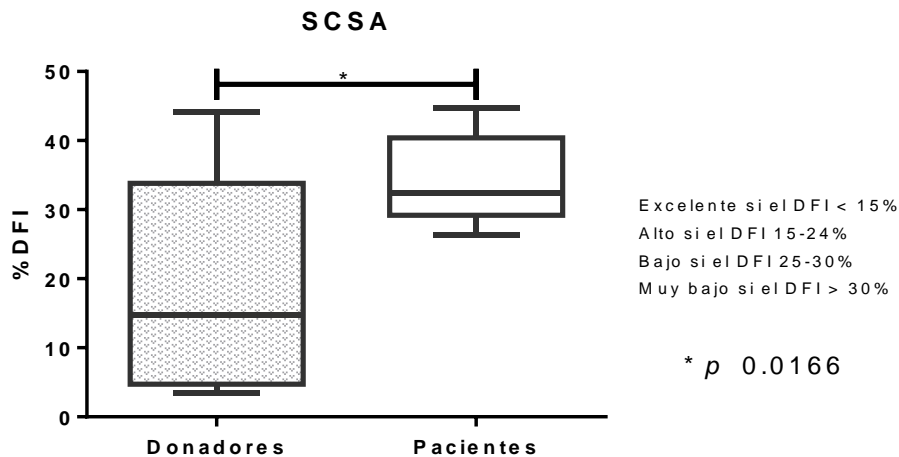
**Gráfica 5. Diferencia en el % DFI evaluado por SCD en muestras criopreservadas por técnica rápida y convencional, procedentes de donantes de banco de semen y pacientes infértiles.**

Esta evaluación mostró diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones realizadas, siendo menor el DFI en muestras de donantes criopreservadas por técnica rápida. Se observa, además, que en pacientes la técnica convencional disminuye el potencial fertilizante a medida que aumenta el DFI, siendo significativamente mayor que en donantes. Las muestras de donantes criopreservadas con la técnica rápida como convencional presentan excelente y alto potencial fertilizante respectivamente, es decir, contienen ADN con menos cantidad de daño por el proceso de congelación. Los pacientes mostraron valores de % DFI elevados, clasificándolos con muy bajo potencial fertilizante. La diferencia entre las técnicas de criopreservación en pacientes no resultó estadísticamente significativa.

## ✓ Método SCSA

Para este procedimiento se identificaron cuatro variables:

- Donantes-Técnica rápida.
  - Donantes-Técnica convencional.
  - Pacientes-Técnica rápida.
  - Pacientes-Técnica convencional.
- ✓ Se comparó el % DFI obtenido por método SCSA, en muestras de donantes de banco de semen vs pacientes infértiles (Gráfica 6).



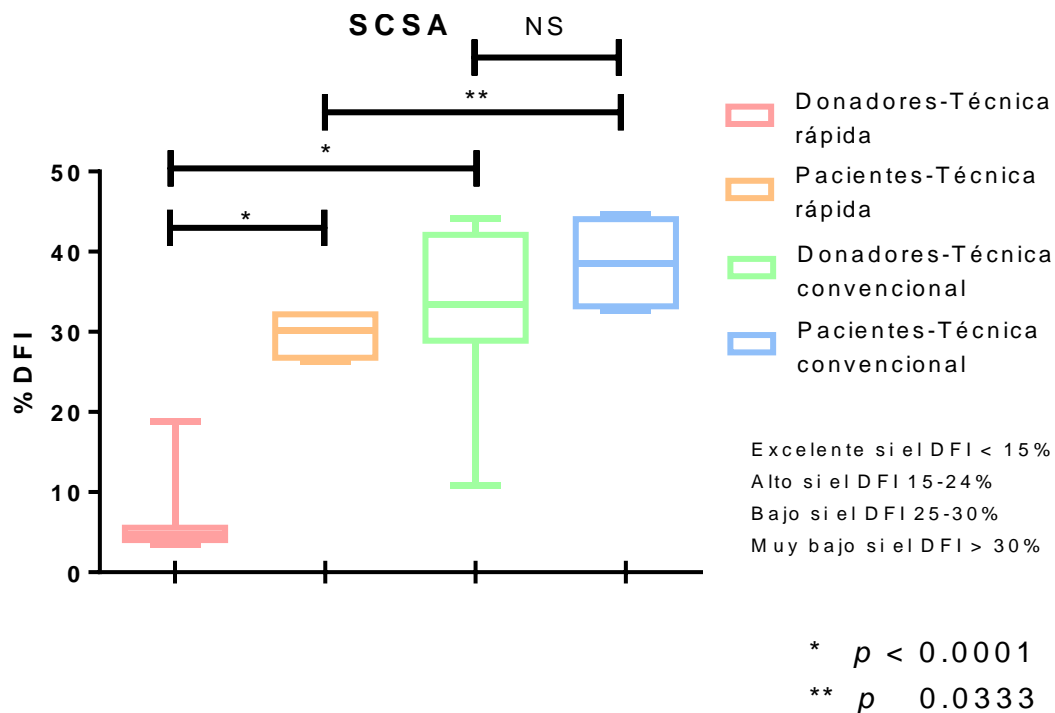
**Gráfica 6. Índice fragmentación de ADN evaluado por método SCSA, en muestras de pacientes vs donantes.**

Al comparar las muestras de donantes y pacientes resultó con diferencia estadísticamente significativa, siendo menor el DFI en muestras de donantes. El gráfico 6 muestra que los pacientes presentan muy bajo potencial fertilizante, ya la media del DFI es mayor al 30%. Las muestras de donantes se localizan en un rango de excelente a muy bajo, pero la mayor concentración mantiene potencial fertilizante alto, con un promedio de 19% de DFI. Estos resultados fueron medidos independientemente de la técnica de congelación.

En la gráfica 7 se expresan los grupos evaluados y las comparaciones realizadas que a continuación se describen.

- ✓ Se comparó el % DFI obtenido por método SCSA, en muestras de donantes de banco de semen vs pacientes infértiles criopreservadas por técnica rápida (B vs D) (Gráfica 7).

- ✓ Se comparó el % DFI obtenido por método SCSA, en muestras de donantes de banco de semen vs pacientes infértiles criopreservadas por técnica convencional (Gráfica 7).
- ✓ Se comparó el % DFI obtenido por método SCSA, en muestras de donantes de banco de semen criopreservadas por técnica convencional vs muestras de donantes de banco de semen criopreservadas por técnica rápida (Gráfica 7).
- ✓ Se comparó el % DFI obtenido por método SCSA, en muestras de pacientes infértiles criopreservadas por técnica convencional vs pacientes infértiles criopreservadas por técnica rápida (Gráfica 7).



**Gráfica 7. Diferencia en el % DFI evaluado por SCSA en muestras criopreservadas por técnica rápida y convencional, procedentes de donantes de banco de semen v pacientes infértiles.**

El método de evaluación por SCSA demostró que las muestras de donantes criopreservadas por técnica rápida no son afectadas por el proceso de congelación, ya que presentó un potencial fertilizante excelente. En contraparte, en muestras de donantes criopreservadas por técnica convencional reveló diferencia estadísticamente significativa siendo mayor el DFI que las criopreservadas por técnica rápida, clasificando el potencial fertilizante en bajo y muy bajo. El método SCSA confirma y correlaciona los datos obtenidos por el método SCD, se obtuvo índices de fragmentación más bajos en muestras de donantes, mientras que en pacientes se afecta significativamente la integridad del ADN ocasionando pérdida del potencial de fertilización tanto en criopreservación rápida como

convencional. La diferencia entre donantes y pacientes criopreservadas por técnica convencional no fue estadísticamente significativa.

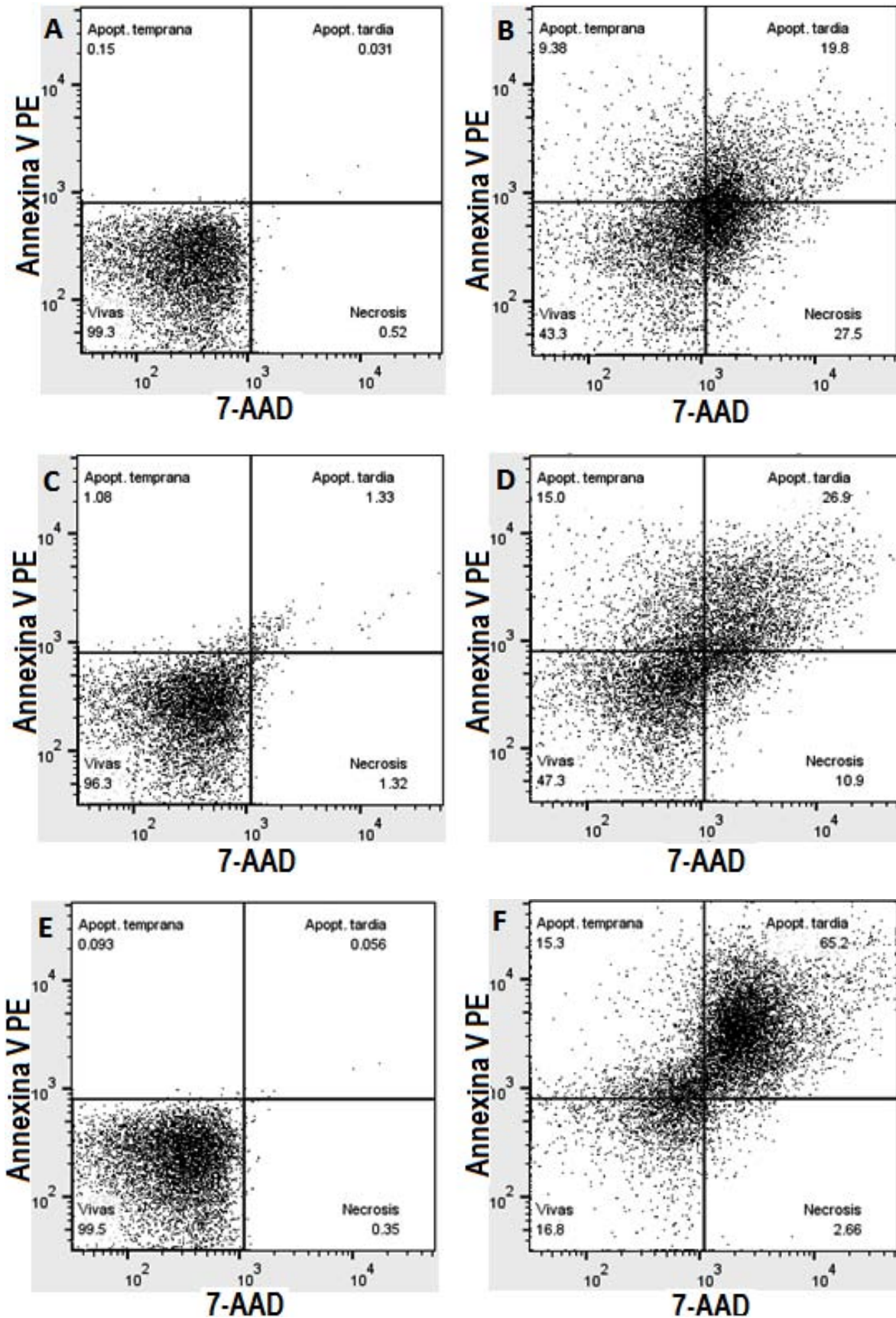
### **Estudio III. Apoptosis**

En este estudio se evaluó la susceptibilidad de las células, el grado de daño o muerte celular programada presente en los cuatro grupos de estudio. Para evaluar la vitalidad y muerte celular se identificaron cuatro variables:

- Células vivas.
- Células en apoptosis temprana.
- Células en apoptosis tardía.
- Necrosis.

Los porcentajes de estas variables se adquirieron de los datos obtenidos en los plots al realizar el análisis en citómetro de flujo (Figura 25).





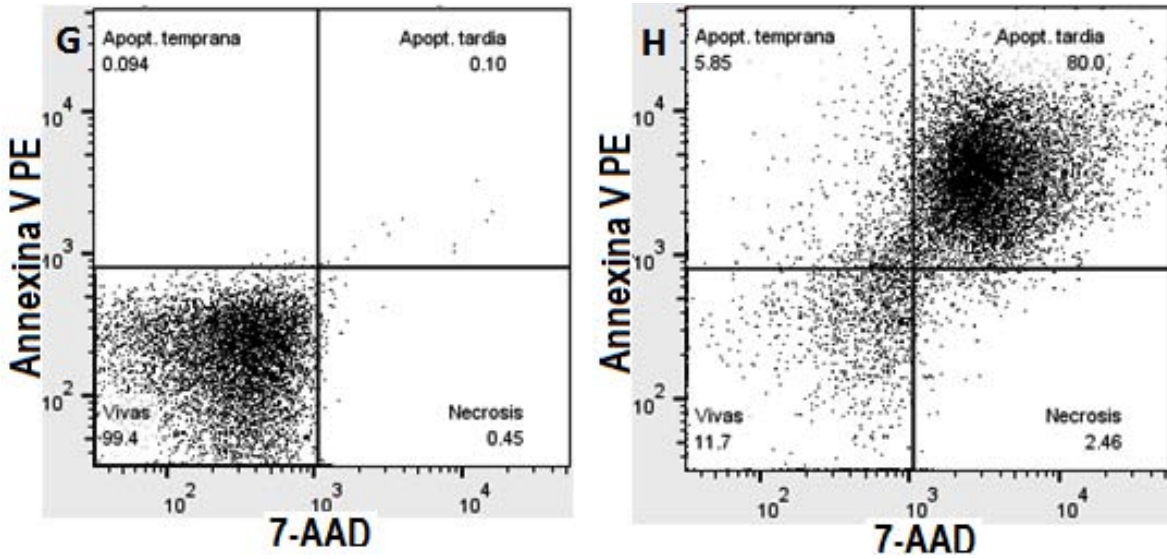
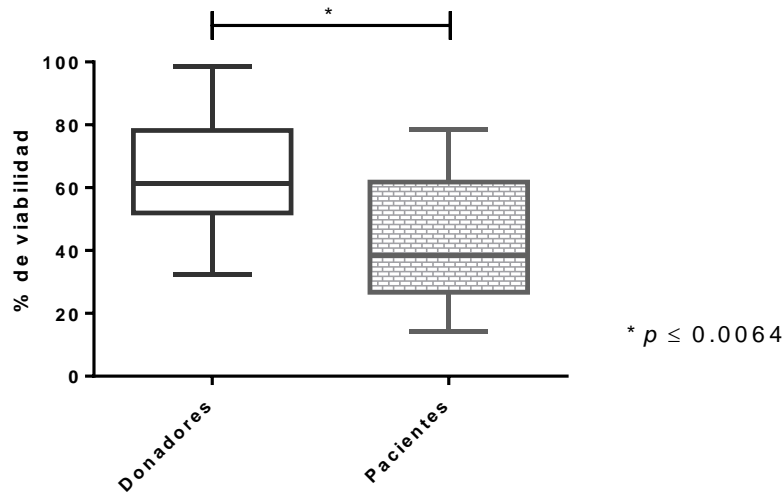


Figura 25. Plots representativos obtenidos por citómetro de flujo. A: Autofluorescencia (control) técnica rápida- Donantes. B: tinción con AV+7-AAD técnica rápida- Donantes. C: Autofluorescencia (control) técnica rápida-Pacientes. D: tinción con AV+7-AAD técnica rápida-Pacientes. E: Autofluorescencia (control) técnica convencional-Donantes. F: tinción con AV+7-AAD técnica convencional-Donantes. G: Autofluorescencia (control) técnica convencional-Pacientes. H: tinción con AV+7-AAD técnica convencional-Pacientes.

### ☞ % de Viabilidad

- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras de donantes de banco de semen vs pacientes infértiles (Gráfica 8).



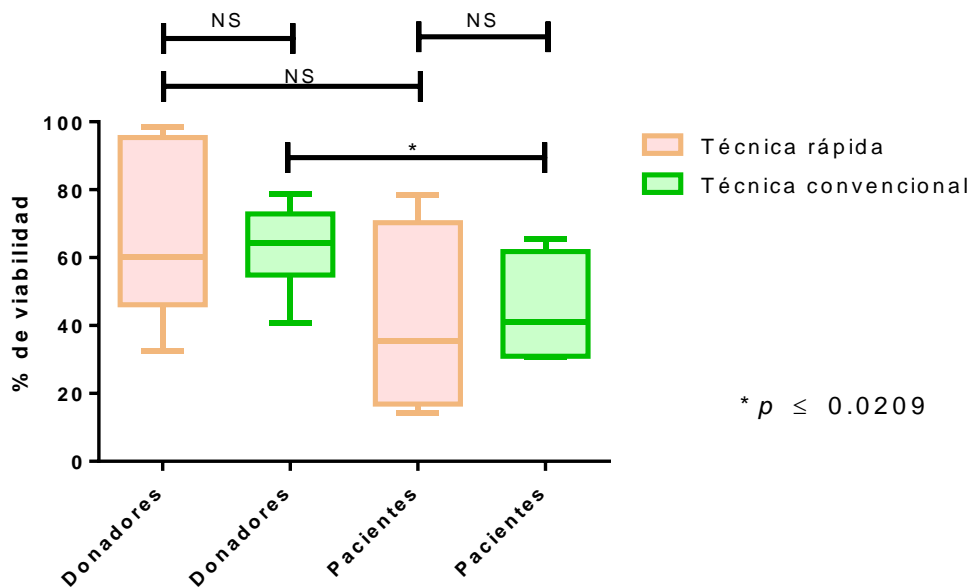
Gráfica 8. Viabilidad Donantes vs Pacientes

La prueba t resulto estadísticamente significativa la diferencia de las muestras de donantes y pacientes respecto al número de células vivas. El gráfico 8 muestra que aún sin distinguir entre técnicas de congelación, se presenta mayor daño a los espermatozoides de pacientes infértiles que en donantes de banco de semen.

### % de viabilidad y técnica

En la gráfica 9 se expresan los grupos evaluados y las comparaciones realizadas que a continuación se describen.

- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica rápida de donantes de banco de semen (Gráfica 9).
- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de pacientes infértiles vs muestras congeladas por técnica rápida de pacientes infértiles (Gráfica 9).
- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica rápida de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica rápida de pacientes infértiles (Gráfica 9).
- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica convencional de pacientes infértiles (Gráfica 9).

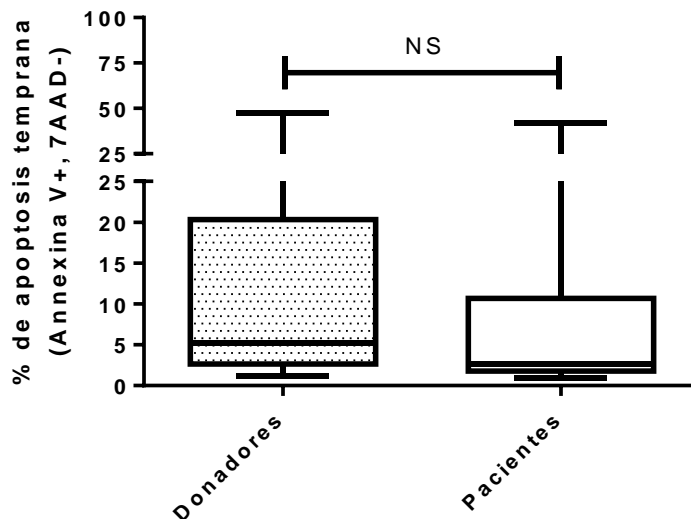


Gráfica 9. Diferencias en la viabilidad de las muestras espermáticas de pacientes infértiles y donantes de banco de semen por diferentes técnicas de congelación.

El gráfico 9 indica que, independientemente de la técnica de congelación, las muestras de semen de donantes presentan menos daños en la membrana plasmática ocasionados por las técnicas de congelación, se observa una disminución en el porcentaje de vitalidad en muestras de pacientes infértiles. Al descongelar las muestras criopreservadas por la técnica rápida se obtienen mayores tasas de sobrevivencia en muestras de donantes comparado con muestras de pacientes. Al descongelar las muestras criopreservadas por la técnica de convencional se muestra que afecta considerablemente a las células de pacientes observando menores índices de supervivencia siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

### % de Apoptosis temprana

- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras de donantes de banco de semen vs pacientes infértiles (Gráfica 10).



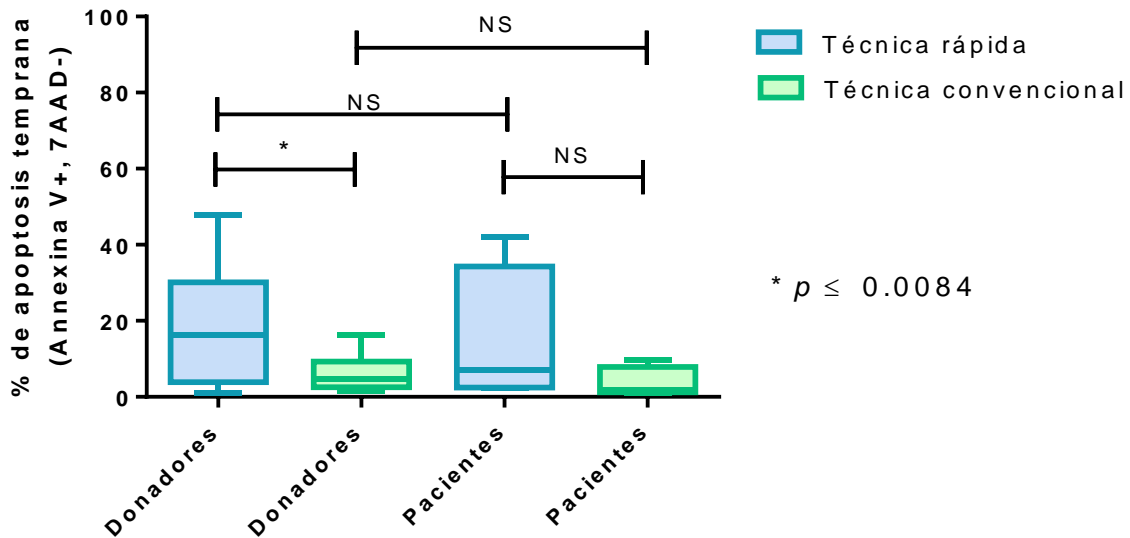
Gráfica 10. Apoptosis temprana. Donantes vs Pacientes.

El gráfico 10 expresa que las muestras de semen de los donantes presentan mayor porcentaje de células en fase de apoptosis temprana en comparación con los pacientes infértiles, es decir, sin hacer distinción de las técnicas de congelación, en general se obtienen mayores tasas de células iniciando procesos tempranos de apoptosis, sin embargo, no fue estadísticamente significativa esta diferencia.

**% de Apoptosis temprana y técnica**

En la gráfica 11 se expresan los grupos evaluados y las comparaciones realizadas que a continuación se describen.

- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica rápida de donantes de banco de semen (Gráfica 11).
- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de pacientes infértiles vs muestras congeladas por técnica rápida de pacientes infértiles (Gráfica 11).
- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica rápida de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica rápida de pacientes infértiles (Gráfica 11).
- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica convencional de pacientes infértiles (Gráfica 11).



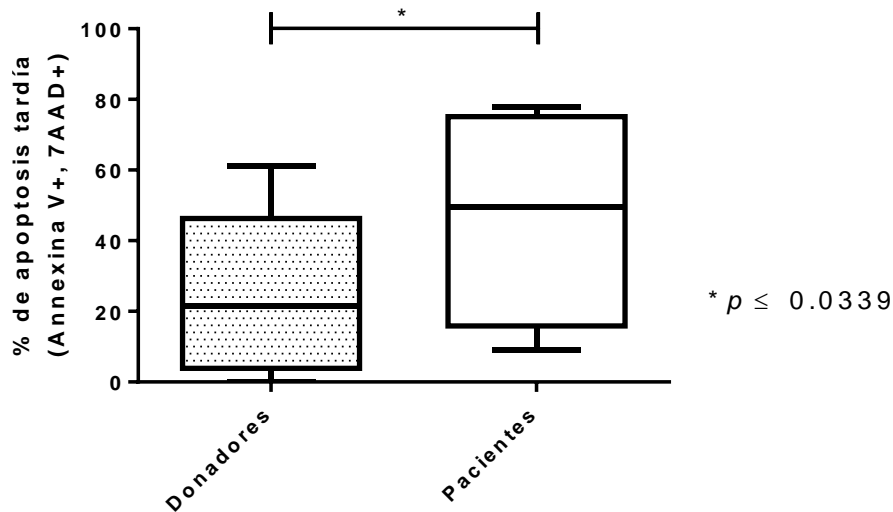
**Gráfica 11. Diferencias en apoptosis temprana de las muestras espermáticas de pacientes infértiles y donantes de banco de semen por diferentes técnicas de congelación.**

El gráfico 11 expresa las diferencias en el daño ocasionado a los cuatro grupos de estudio que sufren procesos de apoptosis temprana. Se observa que las muestras criopreservadas por técnica rápida presentan mayor porcentaje de células en fase de apoptosis temprana, mientras que las muestras congeladas por técnica convencional no muestran porcentajes altos. Se observa diferencia estadísticamente significativa entre muestras de donantes,

siendo menor el grado de apoptosis temprana utilizando la técnica convencional de criopreservación. En general los cuatro grupos de estudio presentaron bajas tasas de apoptosis temprana. Las muestras de pacientes no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

### % de Apoptosis tardía

- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras de donantes de banco de semen vs pacientes infértiles (Gráfica 12).



Gráfica 12. Apoptosis tardía. Donantes vs Pacientes.

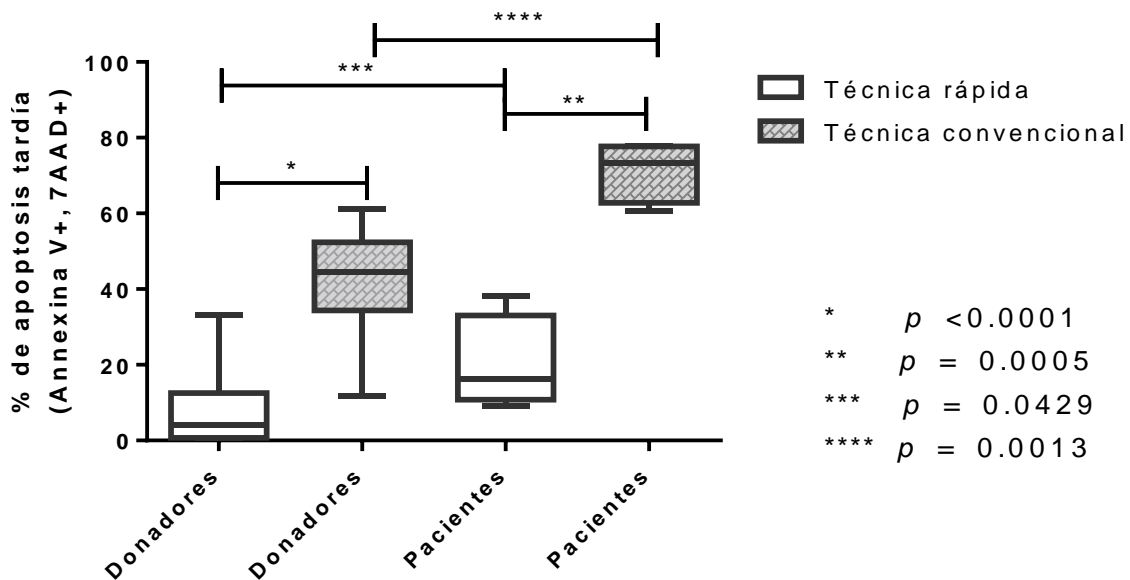
El gráfico 12 expresa que los donantes de banco de semen muestran menor porcentaje de células en apoptosis tardía resultado de la congelación, respecto a los porcentajes obtenidos en las muestras de pacientes infértiles. Estadísticamente hay diferencias significativas entre los grupos analizados. En este procedimiento no se distingue la técnica de congelación.

### % de Apoptosis tardía y técnica

En la gráfica 13 se expresan los grupos evaluados y las comparaciones realizadas que a continuación se describen.

- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica rápida de donantes de banco de semen (Gráfica 13).

- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de pacientes infértiles vs muestras congeladas por técnica rápida de pacientes infértiles (Gráfica 13).
- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica rápida de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica rápida de pacientes infértiles (Gráfica 13).
- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica convencional de pacientes infértiles (Gráfica 13).



**Gráfica 13. Diferencias en apoptosis tardía de las muestras espermáticas de pacientes infértiles y donantes de banco de semen por diferentes técnicas de congelación.**

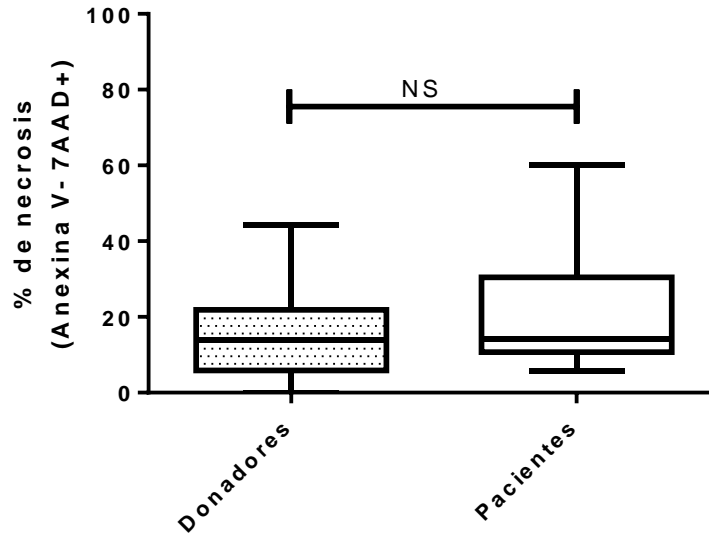
El gráfico 13 representa las diferencias entre los grupos de estudio para este procedimiento. Se observan diferencias significativas en todas las comparaciones realizadas. Se comprueba mediante este procedimiento que las muestras de semen congeladas por técnica convencional presentan mayores porcentajes de apoptosis tardía. Al comparar las muestras de donantes de ambas técnicas se observa porcentaje significativamente mayor de apoptosis tardía en la técnica convencional, mismo efecto que se observa en las muestras de pacientes infértiles, presentando mayor porcentaje de apoptosis tardía en las muestras congeladas por la técnica convencional.

Por lo tanto, resulta favorable congelar mediante técnica rápida, ya que los porcentajes de apoptosis tardía son menores en donantes y pacientes. Se observó que las muestras de donantes presentan menores porcentajes de apoptosis tardía que las muestras de los

pacientes infértiles que son congeladas por la técnica rápida, mismo efecto que resultó en las muestras congeladas por técnica convencional.

### % de Necrosis

- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras de donantes de banco de semen vs pacientes infértiles (Gráfica 14).



Gráfica 14. Necrosis. Donantes vs Pacientes.

El gráfico 14 expresa que los donantes de banco de semen muestran menores porcentajes de células necróticas resultado de la congelación, respecto a los porcentajes obtenidos en las muestras de pacientes infértiles, sin embargo, no fue estadísticamente significativa esta diferencia. Es decir, sin distinguir la técnica de congelación, las muestras de donantes presentan menor cantidad de daños por los procesos de congelación.

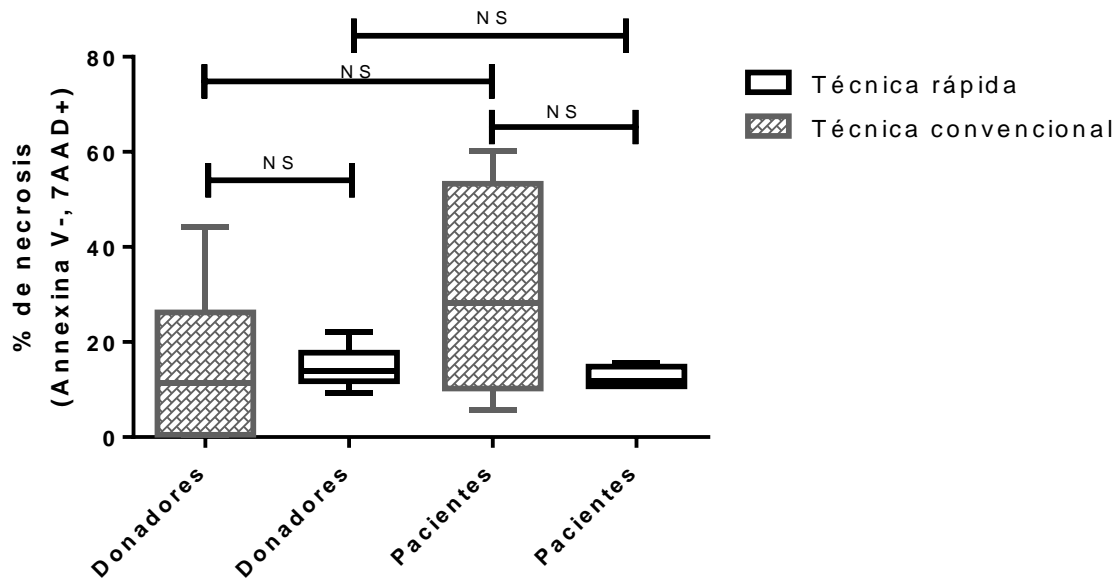
### % de Necrosis y técnica

En la gráfica 15 se expresan los grupos evaluados y las comparaciones realizadas que a continuación se describen.

- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica rápida de donantes de banco de semen (Gráfica 15).



- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de pacientes infértiles vs muestras congeladas por técnica rápida de pacientes infértiles (Gráfica 15).
- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica rápida de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica rápida de pacientes infértiles (Gráfica 15).
- ✓ Se analizó el daño ocasionado a muestras congeladas por técnica convencional de donantes de banco de semen vs muestras congeladas por técnica convencional de pacientes infértiles (Gráfica 15).



Gráfica 15. Diferencias en necrosis de las muestras espermáticas de pacientes infértiles y donantes de banco de semen por diferentes técnicas de congelación.

El gráfico 15 representa las diferencias entre los grupos de estudio analizando los grados de necrosis. No se observan diferencias significativas en todas las comparaciones realizadas. Las muestras de semen congeladas por técnica convencional son más afectadas presentando mayores porcentajes de necrosis. Al comparar las muestras de donantes de ambas técnicas de congelación se observa un daño mayor en la técnica convencional, presentando menos daños al ser congeladas por técnica rápida, mismo efecto que se observa en las muestras de pacientes, presentando mayor daño las muestras congeladas por técnica convencional.

### Discusión

En el presente estudio se analizó la calidad seminal de las muestras de pacientes infértiles y donantes de banco de semen que fueron sometidas a procesos de congelación y descongelación por técnicas de criopreservación rápida y convencional. Se analizó el daño ocasionado a los parámetros seminales, el grado de apoptosis y la fragmentación de ADN.

En numerosos estudios se ha buscado un factor clave que sea predictivo para el potencial de fertilidad masculina, los análisis de semen convencionales incluyen anomalías en concentración, movilidad, el estado del acrosoma, integridad de la membrana celular y morfología espermática e integridad de la cromatina nuclear. La selección de espermatozoides durante técnicas de reproducción asistida se basa en estos criterios (Mangiarini *et al*, 2013; Franken *et al*, 2012; Grunewald *et al*, 2009; Hoogendijk *et al* 2009; Elzanaty *et al*, 2008; Evenson *et al*, 1999). En el presente estudio se evaluó la calidad seminal a los 30 minutos posteriores a la colecta de la muestra, midiéndose los parámetros seminales de concentración, movilidad, morfología, así como el índice de fragmentación espermática, utilizando la técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD).

Estudios previos (Fraczek *et al*, 2013; Lukanov *et al*, 2009; Enciso *et al*, 2009; Muratori *et al*, 2008), reportan que los pacientes con parámetros seminales disminuidos son más propensos a mostrar una mayor proporción de espermatozoides con ADN fragmentado que los hombres con parámetros normales de semen, al igual que los varones con ciertas patologías andrológicas tales como infecciones o varicocele. La Vignera *et al* (2012), además, comprobaron que hombres con sobrepeso u obesidad presentan menor movilidad progresiva y formas normales que hombres con IMC normal. Este estudio mostró que la calidad del semen de pacientes es mucho menor comparado con los valores obtenidos en muestras de donantes siguiendo los estándares establecidos por la OMS (WHO, 2010). Ésto debido a que las muestras de pacientes presentan fertilidad disminuida como consecuencia de infecciones de las vías genitourinarias, edad avanzada o malos

hábitos de vida como fumar, sobrepeso u obesidad (Vendrell *et al*, 2014; Fraczek *et al*, 2013; Dohle, 2010).

El semen de donantes presentó buena calidad según los parámetros establecidos por la OMS (2010) y la paternidad comprobada del donante es una garantía adicional. Los parámetros necesarios para acreditar como donante son un recuento de al menos 60 millones de espermatozoides y una movilidad progresiva total superior al 40% (Pouly *et al*, 2014). En este estudio estas diferencias fueron notables al compararlos con las muestras de pacientes infértiles. En los parámetros evaluados se observó que la concentración en millones fue aproximadamente la mitad en pacientes comparado con las muestras de donantes. Este efecto también se observó en movilidad, morfología e Índice de fragmentación.

Algunos estudios (Fraczek *et al*, 2013; Fujita *et al*, 2011; Rennemeier *et al*, 2009) han prestado atención a las influencias potenciales directas de microorganismos patógenos en los gametos masculinos, y por lo tanto su interacción con espermatozoides humanos, han revelado que distintas moléculas microbianas provocan múltiples efectos perjudiciales sobre los espermatozoides humanos que pueden afectar la movilidad del espermatozoide, inducen muerte celular y tienen efectos tóxicos sobre el ADN, y sobre todo, a dosis subletales pueden causar la pérdida prematura del acrosoma, dificultando la penetración del espermatozoide al ovocito. A las muestras utilizadas en este estudio se les realizó cultivo con el fin de analizar en el semen la presencia de infecciones causadas por bacterias, hongos, etc. Todas las muestras resultaron negativas en espermocultivo para *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum*, tanto en donantes como en pacientes.

Cuantificados estos parámetros se criopreservaron las muestras. Estudios precedentes (Petyim *et al*, 2014; Gallardo *et al*, 2012; Ortega, 2012; Zribi *et al*, 2012; Meamar *et al*, 2012; Jin *et al*, 2010; Oliva *et al*, 2010; Serzedello *et al*, 2006; Paasch *et al*, 2004) han evaluado el daño generado como consecuencia de la criopreservación, informando afectación en la calidad del espermatozoide incluyendo morfología, movilidad, e

integridad del ADN, que finalmente conduce al daño celular y la muerte. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el proceso de congelación y descongelación reduce el porcentaje de espermatozoides vivos, así como pérdida entre 25 y 75% de movilidad y reducción de formas normales tanto en muestras seminales de buena calidad (donantes), como en las de mala calidad (pacientes). Esto debido a la exposición a estrés osmótico, deshidratación celular, formación de letales cristales de hielo intracelulares y extracelulares, maduración de la célula, y la tasa de enfriamiento que genera cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática, reducción del tamaño de la cabeza y externalización de fosfatidilserina.

Estudios previos (Djuwantono *et al*, 2011; Said *et al*, 2010; Dupré *et al*, 2006) establecen que el DMSO es el crioprotector que genera la menor toxicidad para los espermatozoides ya que se obtienen altos porcentajes de espermatozoides móviles reduciendo la formación de cristales de hielo dentro de los espermatozoides. Sin embargo, en estudios previos, se informa que los crioprotectores, además de sus propiedades crioprotectoras, pueden ser desencadenantes de muerte celular programada (apoptosis) debido al impacto del glicerol en la actividad de las caspasas (Wündrich *et al*, 2006). En nuestro estudio se utilizó crioprotector a base de DMSO, observando que la afectación a las tasas de viabilidad, formas normales, movilidad y apoptosis se debe a la velocidad de congelación más no al crioprotector usado.

Otros estudios (Di Santo *et al*, 2012; Benson *et al*, 2012; Partyka *et al*, 2010; Isachenko *et al*, 2008) reportan que la movilidad de los espermatozoides sometidos a criopreservación se reduce a causa de algunos cambios en el transporte activo. Yogev *et al* (2010), reportó que el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos en muestras descongeladas de donantes almacenadas hasta 14 años en bancos de semen no disminuye. Los resultados mostrados en este estudio contrastan con lo reportado por Yogev *et al* (2010) ya que se halló que el almacenamiento de espermatozoides Independientemente de la técnica utilizada para criopreservar disminuye la cantidad de espermatozoides con movilidad progresiva a la vez que aumentan los espermatozoides con movilidad no progresiva e

inmóviles. Esto se debe, probablemente a un deterioro de la actividad mitocondrial que puede explicar la reducción de la movilidad, cambios en el transporte activo y la permeabilidad de la membrana plasmática en la región de la cola, por un cambio en la disponibilidad de energía o una lesión en los elementos del axonema.

A pesar de la pérdida de movilidad, se considera que las muestras son aceptables cuando conservan más del 30% de movilidad progresiva tras la descongelación (Torres *et al*, 2009). En nuestro estudio, las muestras de donantes, tanto en fresco como después de la descongelación mantuvieron más del 30 % de movilidad progresiva, mientras que las muestras de pacientes tras la descongelación no llegaron al 30%.

En este estudio se mostró que los parámetros seminales de movilidad, concentración y morfología son más afectados cuando las muestras se congelan por técnica convencional (enfriamiento lento) que cuando se utiliza la técnica rápida tanto en los pacientes como en los donantes. El enfriamiento lento requiere la disminución gradual de la temperatura con ciertas tasas de congelación. Las consecuencias de la congelación lenta y gradual causan lesión celular, lo que resulta en la muerte celular, especialmente en el rango de temperaturas críticas de -15 °C a -60 °C (Oliva *et al*, 2010).

Rennemeier *et al* (2009), observaron una reducción en la movilidad de los espermatozoides que coincidió en una forma dependiente con la cantidad de células en apoptosis y necrosis. Gallardo *et al* (2012) observó que la pérdida de movilidad se correlaciona con el porcentaje de espermatozoides necróticos. Se observó en el presente estudio una relación entre la pérdida de viabilidad y movilidad progresiva con el aumento de células apoptóticas tempranas, tardías y necróticas. Debido a las afectaciones en la calidad de espermática por los mecanismos que causan lesiones y muerte celular, la congelación rápida resulta una mejor alternativa por su tasa de enfriamiento rápido y alta viscosidad.

A pesar de la disminución en los parámetros seminales se observó que resulta favorable criopreservar las muestras de donantes por técnica rápida, ya que los valores continúan siendo aceptables según lo establecido por la OMS (2010) aún después de la

descongelación. Cuando se descongelaron muestras de donantes criopreservadas por técnica convencional, también se obtuvieron altos porcentajes en los parámetros seminales, pero los valores obtenidos por técnica rápida son mayores alrededor del 15 %, no obstante, si presentan diferencia comparando los datos con los obtenidos en las muestras en fresco. En cuanto a muestras de pacientes, los datos obtenidos en la descongelación no presentan diferencias importantes cuando se comparan los dos métodos de congelación, sin embargo, si hay reducción en valores comparados con las muestras en fresco. Esto comprueba que los dos métodos de criopreservación afectan la calidad espermática tanto en pacientes como donantes, sin embargo, no se observan importantes diferencias en cuanto al daño generado por las técnicas.

Robinson *et al* (2012), informan que en el 70% de abortos involuntarios están presentes anomalías cromosómicas y la mayoría de casos son de origen materno que surgen durante la meiosis, mientras que Young *et al* (2003), estiman que el 85% de las aberraciones cromosómicas encontradas en los recién nacidos se producen en las células germinales de origen paterno, con la mayoría de las mutaciones genéticas en los espermatozoides debido a la rotura en la cadena de ADN en lugar de reordenamiento, es por esto que este estudio se centró en la evaluación de la integridad del ADN.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que las muestras de donantes de banco de semen presentan un excelente potencial fertilizante (bajo DFI) cuando se evalúan inmediatamente después de la colecta por método SCD. Después del proceso de criopreservación los valores obtenidos muestran que la técnica de congelación rápida mantiene el potencial fertilizante excelente, sin embargo, el método convencional incremento el índice de fragmentación generando una reducción del potencial fertilizante. No obstante, el mayor daño se creó en muestras de pacientes con problemas de fertilidad, ya que cuando se evaluaron inmediatamente después de la colecta, el potencial fertilizante fue en promedio bajo, mientras que después del procedimiento de criopreservación el potencial fertilizante fue en promedio muy bajo.

Rougier *et al* (2013), mostraron que las muestras congeladas presentan una mayor fragmentación de ADN que las muestras en fresco. Los resultados del presente estudio muestran que mediante la técnica SCSA en donantes de banco de semen el potencial se mantuvo excelente utilizando la técnica de criopreservación rápida. Sin embargo empleando la técnica convencional se halló que el potencial fertilizante se ve severamente afectado. Este efecto se produce de la misma manera en pacientes, ya que redujo el potencial fertilizante en muestras criopreservadas por método convencional. Se observó gran diferencia entre las muestras en fresco y descongeladas evaluando por SCD y SCSA. Además, casi todos los espermatozoides, incluso en donantes de semen presentaron algún nivel de daño detectable.

Chohan *et al* (2006), compararon los diversos métodos de evaluación de fragmentación de ADN espermático, en su estudio no obtuvieron diferencias a considerar en los resultados de SCD y SCSA en pacientes y hombres fértiles, es decir, muestran niveles similares de fragmentación del ADN y predicen los mismos niveles de daño. Este estudio muestra que el índice de fragmentación medido por SCD fue mucho menor en muestras de donantes que en pacientes. Estos datos comprueban que el método de criopreservación rápido es eficaz para el mantenimiento del potencial fertilizante, ya que se obtuvo menor afectación a la molécula de ADN utilizando esta técnica en donantes y pacientes. El método SCSA mostró el mismo resultado, el índice de fragmentación fue menor en muestras de donantes que en pacientes. De igual manera, mediante SCSA se comprueba que la congelación rápida es eficaz para mantener en condiciones adecuadas la molécula de ADN ya que se logró tasas más bajas de fragmentación tanto en donantes como en pacientes.

En nuestros resultados se encontró que los donantes tienen un porcentaje mucho mayor de espermatozoides con grandes halos, en comparación con hombres infértiles. Los hombres con valores de DFI de 15% o menos (excelente potencial fertilizante) también mostraron un mayor número de halos de tamaño mediano a grande en comparación con los individuos con valores de DFI superiores a 15% (potencial fertilizante alto, bajo y muy bajo). Esto se debe probablemente a la velocidad de enfriamiento de la técnica de

congelación rápida, ya que el tiempo en que se deshidrata la célula, especialmente las estructuras flagelares, es suficiente para que las moléculas de agua sean reemplazadas por moléculas de crioprotectante, y así aumente la viscosidad de los líquidos intra y extracelulares para obstaculizar la difusión, deteniendo finalmente todos los procesos celulares. Se evita la agregación de las moléculas que causan la formación de cristales de hielo intracelular de gran tamaño y que provocan la destrucción o alteración de las estructuras u organelos del espermatozoide (Ávila *et al*, 2006; Meseguer *et al*, 2002).

Este informe contrasta con lo reportado en estudios previos (Dupré *et al*, 2006; Hori *et al*, 2006) en los cuales utilizando una tasa de enfriamiento lento (-15°C/min) obtuvieron los mayores porcentajes de movilidad concluyendo que con tasas de congelación rápida (-18,8 °C/min) no hay suficiente tiempo para la deshidratación de los espermatozoides. En el presente estudio se utilizó la criopreservación rápida, es decir, las muestras fueron sumergidas directamente en NL<sub>2</sub> y se observó que preserva una adecuada función celular en un alto número de espermatozoides.

Estudios previos (Vutyavanich *et al*, 2012; Berrios *et al*, 2011) refieren que existe una significativa activación de la producción de especies reactivas de oxígeno, que conlleva a una prematura capacitación espermática, evento que es necesario de modular, especialmente si se utilizan estas células en técnicas de inseminación intrauterina, por lo que sugieren adición de antioxidantes a los medios de congelación para la optimización de la técnica. Sin embargo, Meamar *et al* (2012) utilizaron extractos de *Opuntia ficus-indica* por sus propiedades antioxidantes en el medio crioprotector concluyendo que solo es ligeramente eficaz en la prevención de efectos dramáticos de la fragmentación de ADN espermático.

Entre las características que hacen más ventajosa la congelación rápida frente a la criopreservación convencional, se encuentran la rapidez con la que puede ser realizada, la facilidad de su procedimiento y el no necesitar de instrumental sofisticado para su ejecución, lo cual disminuye su costo, elementos importantes al momento de determinar los costos para la conservación celular. La mortalidad espermática producida durante la



criopreservación lenta podría estar originada por el efecto de los crioprotectores, estrés celular y estrés osmótico (Dupré *et al*, 2006). Todos estos elementos afectarían severamente el volumen celular, al exponer los espermatozoides a ciclos de congelamiento y descongelamiento.

Una posible explicación para los mismos resultados de SCSA y la prueba de SCD radica en el hecho de que los espermatozoides de hombres con parámetros anormales de semen se caracterizan por niveles más altos de ruptura en la cadena de ADN, lo que puede ser indicativo de apoptosis. Ortega *et al* (2010), observaron una fuerte correlación entre estas dos pruebas, sin embargo, concluyen que todavía no es del todo conocido cómo estas técnicas, que miden la integridad de la molécula del ADN, pueden ayudar a identificar problemas de fertilidad y cómo afectan a la posibilidad de gestación en reproducción asistida. Otro estudio (Jun *et al*, 2011) ha demostrado que la evaluación del DFI junto con el análisis básico mejora la calidad de evaluación de semen.

Enciso *et al* (2006), muestran mediante la evaluación de la integridad del ADN en los espermatozoides que la frecuencia de espermatozoides que contienen ADN fragmentado es mayor en hombres infértiles en comparación con varones fértiles. Las variaciones que se presentaron en los resultados entre los métodos de evaluación de fragmentación de ADN no fueron significativas. Nuestros resultados indican que los pacientes infértiles presentan mayor índice de fragmentación de ADN que los donantes de banco de semen, esto a pesar de que la concentración del fijador, el tiempo de almacenamiento de las muestras, el fluorocromo utilizado para etiquetar roturas en el ADN, y el método utilizado para analizar los datos, pueden afectar en gran medida los resultados de la fragmentación de ADN espermático, como demostraron Muratori *et al* (2010).

Estudios recientes han propuesto el uso de marcadores de apoptosis para mejorar la predicción del potencial de fertilidad en la práctica clínica (Zorn *et al*, 2012). El presente estudio se ha centrado en la evaluación de la muerte celular inducida por el proceso de congelación y descongelación de espermatozoides debido principalmente a la formación de hielo intracelular y estrés quimio-osmótico, que conducen a la ruptura de la membrana

plasmática y posterior necrosis. Para obtener las tasas de apoptosis en espermatozoides se utilizó AV (Anexina V) y 7-AAD (7-amino-actinomicina) en ensayos de citometría de flujo. Se prevé que estos ensayos junto con los nuevos métodos de genómica, podrían aumentar el poder predictivo del estado de fertilidad y ayudar a identificar las subpoblaciones sensibles de los hombres en riesgo de infertilidad, abortos espontáneos y defectos de nacimiento (Cordelli *et al*, 2005).

En estudios previos se ha investigado la activación de apoptosis por técnicas de citometría de flujo (Kim *et al*, 2013; Yan *et al*, 2013; Zorn *et al*, 2012; Gozávez *et al* 2009), en los cuales hubo un aumento en la tinción de espermatozoides después de la inducción de apoptosis. En el presente estudio los procesos de congelación y descongelación por técnicas convencional y rápida se tomaron como agentes inductores de apoptosis y el grado de daño fue evaluado inmediatamente después de la descongelación de muestras de donantes de banco de semen y pacientes infértiles. Se observó aumento de la tinción de espermatozoides después de la inducción de la apoptosis en muestras de pacientes, es decir, aumento de células en apoptosis o necrosis y disminución de células vivas. Esto como resultado de procesos perjudiciales durante la congelación y descongelación, tales como el choque térmico con formación de cristales de hielo intracelulares y extracelulares, la deshidratación celular y choque osmótico (Di Santo *et al*, 2012). En muestras de donantes de banco de semen las tasas de células vivas fueron mayores, datos que demuestran que las células de donantes son menos afectadas por los procesos de criopreservación independientemente del método de congelación. Los espermatozoides de donantes ha llevado a la utilización exclusiva de semen criopreservado, sin embargo, la criopreservación se asocia con daño irreversible afectando tanto a la recuperación de las células móviles, morfológicamente normales y las tasas de embarazo consiguientes (Wolf *et al*, 2001).

El enfoque para la criopreservación de espermatozoides es diluir el semen con crioprotector y conservar a temperaturas de nitrógeno líquido, procesando la muestra hasta que se descongela y se prepara para su uso. Sin embargo, pocos estudios han

comparado directamente la eficacia de una técnica de congelamiento en contra de otra (rápida vs convencional).

Estudios previos (Vutyavanich *et al*, 2012; Jin *et al* 2010, Hori *et al*, 2006; Centola *et al*, 1992) han informado que espermatozoides de humano almacenados en vapor de  $NL_2$  mostraron buena viabilidad y movilidad después de la descongelación. En el presente estudio se comparó el daño generado por las técnicas de congelación rápida y convencional, se evaluó las tasas de viabilidad resultado del procedimiento de congelación. Las muestras de donantes de banco de semen criopreservadas por técnica rápida mostraron altos índices de células vivas, mientras que en criopreservadas por método convencional se redujo el porcentaje de células vivas, sin embargo, es notable que el grado de afectación es mayor en muestras de pacientes, ya que el porcentaje de células vivas se reduce drásticamente. Con esto se comprueba que es favorable criopreservar por método rápido, ya que se obtiene mejores tasas de supervivencia espermática, es decir, se obtuvieron altos porcentajes de células vivas después de la descongelación.

En estudios previos, se ha observado una alta correlación entre espermatozoides vivos, apoptóticos y muertos con el grado de fragmentación de ADN y los parámetros convencionales de semen (Kim *et al*, 2013; Zorn *et al*, 2012). En este estudio se evaluó, además, las etapas de apoptosis temprana y tardía en muestras descongeladas de pacientes infértiles y donantes de banco de semen. Se obtuvo mayor índice de apoptosis en etapa temprana en las muestras procedentes de donantes. Cuando se comparó las muestras por los métodos de congelación se halló que las muestras criopreservadas por técnica rápida presentan mayores porcentajes de células en apoptosis temprana que las muestras criopreservadas por método convencional, mismo efecto que fue observado en muestras de pacientes infértiles. Sin embargo, en fase de apoptosis tardía se obtuvieron valores inversos, es decir, la mayor concentración de células en apoptosis avanzada o tardía se localizó en muestras procedentes de pacientes infértiles. Cuando se comparó el método de criopreservación se obtuvo un hallazgo importante. En muestras de donantes

se comprobó que el método rápido es un procedimiento adecuado para criopreservar, ya que se obtuvo menor índice de células en apoptosis tardía comparado al obtenido en el método convencional. En pacientes, las muestras que fueron criopreservadas por técnica convencional aumentó el daño generando mayor cantidad de células en apoptosis tardía. El porcentaje de células necróticas no fue diferente entre donantes y pacientes, sin embargo, fue en promedio menor en muestras de donantes. Cuando se comparó la técnica de criopreservación se observó que la técnica convencional aumenta el porcentaje de espermatozoides en necrosis siendo las muestras de pacientes criopreservadas por técnica convencional las más afectadas.

Rodríguez *et al* (2012), evaluaron el varicocele y leucocitospermia, en los cuales se reconoce la incidencia de niveles elevados de estrés oxidativo que es una de las causas que puede explicar la presencia de niveles elevados de daño en la molécula de ADN y demostraron un aumento significativo de la fragmentación del ADN espermático en las muestras seminales de estos pacientes que los observados en donantes o en varones con factor masculino no determinado. La fragmentación de ADN de espermatozoide humano se asocia con un aumento del estrés oxidativo durante la criopreservación, por la activación de caspasas y apoptosis (Thompson *et al*, 2009; Agarwal *et al*, 2004).

Entre los marcadores de apoptosis, el daño al ADN ha sido el más investigado hasta el momento. Se considera un marcador significativo de la calidad del semen y un predictor significativo en el diagnóstico de la infertilidad masculina y de la concepción natural (Zorn *et al*, 2012; Nohales *et al*, 2012; Robinson *et al*, 2012; Enciso *et al*, 2009).

La apoptosis es irreversible, pero las células pueden reparar el daño de manera que ya no se ven, la explicación es que no todas las células dañadas mueren y desaparecen como reporta Collins (2004), mediante cometas en gel que indican que las células están aún presentes. En general, la apoptosis puede ser inducida considerablemente durante la espermatogénesis, y los espermatozoides se vuelven rápidamente necróticos después de la criopreservación. A diferencia de la apoptosis, la necrosis podría ser la vía principal que influye en la viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación (Dogan *et al*,

2013). Por lo tanto, se deben realizar más estudios clínicos para determinar el mecanismo molecular de las vías de apoptosis incluyendo la expresión y el papel de las proteínas apoptóticas.

A pesar de la fragmentación en el ADN espermático generada como consecuencia de los procesos apoptóticos, por su elevada compactación, el ADN no llega a fragmentarse totalmente y el espermatozoide puede no anular su capacidad fecundante. Es posible que espermatozoides apoptóticos con niveles elevados de daño en el ADN puedan fecundar al ovocito. Además, en estudios previos se ha propuesto que la fragmentación de ADN espermático podría influir en la fertilización, la calidad del embrión y el desarrollo del blastocisto o pérdidas del embarazo, es decir, espermatozoides con ADN dañado pueden fecundar ovocitos con éxito y dar embriones de buena calidad que posteriormente no logran implantar o resultan en pérdida de embarazo (Kim *et al*, 2013; Aitken *et al*, 2011; Chohan *et al*, 2006). Robinson *et al* (2012), sugieren que esto podría explicar los abortos involuntarios espontáneos que ocurren aproximadamente en el 15% de la población fértil normal, tasa que aumenta en parejas infértiles. Kovács *et al* (2008), mencionan que en hombres fértiles sanos, al menos 6% de espermatozoides presentan un número anormal de cromosomas. Los espermatozoides son incapaces de reparar el ADN, sin embargo, el ovocito es capaz de reparar daño en el ADN después de la fertilización. El impacto negativo de la alta fragmentación del ADN en el embarazo puede ser superado mediante el uso de ovocitos de alta calidad, sin embargo esta capacidad innata de reparación se debilita en mujeres de edad avanzada. En otro estudio realizado por Hosseinifar *et al* (2013), evaluaron la respuesta del tratamiento con hCG y hMG en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico y concluyeron que a pesar de la baja calidad de los espermatozoides, se redujo el daño al ADN espermático, lo que puede dar lugar a embarazos exitosos.

- El proceso de criopreservación y la posterior descongelación aumentaron el daño espermático en los parámetros básicos del semen (concentración, movilidad y morfología). Sin embargo, se observó que la técnica rápida de congelación mantiene porcentajes altos de movilidad progresiva, mientras que la congelación convencional redujo significativamente este parámetro a la vez que aumentó la movilidad no progresiva y espermatozoides inmóviles.
- El índice de fragmentación espermático aumentó a consecuencia de la criopreservación cuando se utilizó la técnica convencional y rápida. No obstante, la congelación rápida mostró menor porcentaje de daño al ADN en comparación al daño generado por la técnica convencional tanto en donantes como pacientes.
- Se comprobó que los métodos SCSA y SCD se pueden utilizar indistintamente en la evaluación de fragmentación de ADN, ya que los resultados obtenidos no muestran variaciones significativas.
- La muerte celular programada aumentó en relación al índice de fragmentación de ADN. Se encontró mayor número de espermatozoides viables o en fases tempranas de apoptosis en muestras de donantes de banco criopreservadas por técnica rápida, mientras que las muestras de pacientes congeladas por técnica convencional mostraron mayor porcentaje de espermatozoides en apoptosis tardía y necrosis.
- El presente estudio demuestra que la congelación rápida resulta favorable para su utilización en clínicas de reproducción asistida, ya que, a pesar del daño presenta mejor calidad espermática en la descongelación.
- En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se recomienda la evaluación de la fragmentación de ADN dentro de los estudios básicos de semen en los laboratorios de andrología de las clínicas de reproducción asistida.

- ✍ Agarwal A., Said TM. (2004). ***Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach***. BJU International. No. 95. Págs. 503-507.
- ✍ Aitken RJ., Koppers AJ. (2011). ***Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa***. Asian Journal of Andrology. No. 13. Págs. 36-42.
- ✍ Arencibia AD., Fernández RL. (2003). ***Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro***. Revista de toxicología en línea. Pág. 33. Ciudad de La Habana, Cuba.
- ✍ Ávila PL., Madero J., López C., León M., Acosta L., Gómez C. (2006). ***Fundamentos de criopreservación***. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. Vol. 57. No. 4. Págs. 291-300.
- ✍ Barret KE., Barman SM., Boitano S., Brooks HL. (2013). ***Ganong Fisiología Médica***. 24va edición. Ed. Mc Graw Hill. Pág. 422.
- ✍ Baust JM., Buskirk RV., Baust JG. (1999). ***Cell viability improves following inhibition of Cryopreservation-induced apoptosis***. JStore In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal. Núm. 36. Págs. 262-270.
- ✍ BD Biosciences (2008). Technical Data Sheet ***PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I***. BD Pharmingen™. Nº 559763 Rev. 8.
- ✍ BD Biosciences (2011). Technical Data Sheet ***7-AAD***. BD Pharmingen™. Nº 559925 Rev. 8.
- ✍ Benson JD., Woods EJ., Walters EM., Critser JK. (2012). ***The cryobiology of spermatozoa***. Theriogenology. No. 78. Págs. 1682-1699.
- ✍ Berrios O., Sánchez R. (2011). ***Congelación Ultra Rápida de Espermatozoides Humanos: Efecto sobre la Función Espermática y Producción de Especies Reactiva de Oxígeno***. Int. J. Morphol. Vol. 29. No. 3. Págs. 899-906.
- ✍ Brugo OS., Chillik C., Kopelman S. (2003). ***Definición y causas de la infertilidad***. Revista colombiana de obstetricia y ginecología. Vol. 54 No. 4. Págs. 227-248.
- ✍ Bungum M. (2012). ***Sperm DNA Integrity Assessment: A New Tool in Diagnosis and Treatment of Fertility***. Obstetrics and Gynecology International.
- ✍ Campos I., Magán RM., Ruzafa C., Muriel L. (2008). ***Congelación de semen en píldoras***. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J., Cobo

- A., Romero J., De los Santos MJ., Pellicer A. 3ra ed. Mc. Graw-Hill Interamericana. Cap. 4. Págs. 33-37.
- ☞ Canda SA. (2007). *Rafts lipídicos e IL-12R: nuevos avances en el control de la actividad proliferativa de IL-12*. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela.
- ☞ Centola GM., Raubertas RF., Mattox JH. (1992). *Cryopreservation of Human Semen. Comparison of Cryopreservatives, Sources of Variability, and Prediction of Post-thaw Survival*. Journal of Andrology, Vol. 13. No. 3. Págs. 283-288.
- ☞ Centro Nacional de Biotecnología. (s.f.). *Citometría de flujo*. Consultado de [http://www.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic\\_en/Review/citometria\\_de\\_flujo.htm](http://www.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm)
- ☞ Cerezo PG., Castilla AJ., Rodríguez HH. (2014). *Manual para el análisis básico de semen: una guía práctica* (1ra ed.). México D.F. Prado.
- ☞ Chohan KR., Griffin JT., Lefromboise M., De Jonge C., Carrell D. (2006). *Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm*. Journal of Andrology. Vol. 27, No. 1.
- ☞ Collins AR. (2004). *The Comet Assay for DNA Damage and Repair*. Molecular Biotechnology. Vol. 26. Págs. 249-261.
- ☞ Cordelli E., Eleuteri P., Leter G., Rescia M., Spanó M. (2005). *Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity*. Contraception. No. 72. Págs. 273-279.
- ☞ Cortés GE., Dávila RM., López FC., Fernández J., Gosálvez J. (2007). *Evaluación del daño en el DNA espermático*. Actas urológicas españolas, 31(2), 120-131.
- ☞ Cruz I., Colmenares M., Berrueta CL., Gomez PR., Montes H., Berrueta L. (2010). *Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen*. Investigación Clínica. Vol. 51. No. 1. Págs. 87-99.
- ☞ Di Santo M., Tarozzi N., Nadalini M., Borini A. (2012). *Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART*. Advances in Urology. Vol. 2012. No. 854837.
- ☞ Djuwantono T., Wirakusumah FF., Achmad TH., Sandra F., Halim D., Faried A. (2011). *A comparison of cryopreservation methods: Slow-cooling vs. rapid-cooling based on cell viability, oxidative stress, apoptosis, and CD34+*



- enumeration of human umbilical cord blood mononucleated cells.* BioMed Central. Vol. 4. No. 371.
- 🌀 Dogan S., Mason MC., Govindaraju A., Belser L., Kaya A., Stokes J., Rowe D., Memili E. (2013). ***Interrelationships Between Apoptosis and Fertility in Bull Sperm.*** Journal of Reproduction and Development. Vol 59. No. 1. Págs. 18-26.
- 🌀 Dohle G., Diemer T., Giwercman A., Jungwirth A., Kopa Z., Krausz C. (2010). ***Guía clínica sobre la infertilidad masculina.*** European Association of Urology.
- 🌀 Dupré E., Joo R. (2006). ***Viabilidad de espermatozoides criopreservados de macha Mesodesma donacium (Mollusca, Bivalvia).*** Investigaciones Marinas. Vol. 34. No. 2. Págs. 187-190.
- 🌀 Elzanaty S., Malm J. (2008). ***Comparison of semen parameters in samples collected by masturbation at a clinic and at home.*** Fertility and Sterility. Vol. 89, No. 6.
- 🌀 Enciso M., Sarasa J., Agarwal A., Fernández JL., Gozávez J. (2009). ***A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa.*** Reproductive BioMedicine Online. Vol. 18. No. 5. Págs. 606-616.
- 🌀 Espinoza NO., Sarabia L. (2011). ***Evaluación y Estandarización de la Calidad del Espermiograma: Nuevos Límites Inferiores de Referencia.*** Int. J. Morphol, 29(3), 885-890.
- 🌀 Evenson DP (2013). ***Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®).*** Spermatogenesis: Methods and Protocols Chapter 14. Methods in Molecular Biology, vol. 927.
- 🌀 Evenson DP., Jost LK., Marshal D., Zinaman NJ., Clegg E., Purvis K., Angelis P., Clausen OP. (1999). ***Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic.*** Human Reproduction. Vol. 14. No. 4.
- 🌀 Evenson DP., Larson KL, Jost LK. (2002). ***Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.*** J Androl. 2002; (23): 25-43.
- 🌀 Fraczek M., Szumala A., Dworacki G., Sanocka D., Kurpisz M. (2013). ***In vitro reconstruction of inflammatory reaction in human semen: effect on sperm DNA fragmentation.*** Journal of Reproductive Immunology. No. 100. Págs. 76-85.
- 🌀 Franken DR., Oehninger S. (2012). ***Semen analysis and sperm function testing.*** Asian Journal of Andrology. No. 14. Págs. 6-13.

- ✍ Fujita Y., Mihara T., Okazaki T., Shitanaka M., Kushino R., Ikeda C., Negishi H., Liu Z., Richards JS., Shimada M. (2011). ***Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis.*** Human Reproduction. Vol. 26. No. 10. Págs. 2799-2806.
- ✍ Gallardo BJ., Miró MA., Balao SC., Morillo RA., Dávila PM., Aparicio IM., Tapia JA., Ortega FC., Peña FJ. (2012). ***Autophagy and Apoptosis Have a Role in the Survival or Death of Stallion Spermatozoa during Conservation in Refrigeration.*** PLoS ONE. Vol. 7. No. 1.
- ✍ Ganong W. (2006). ***Fisiología médica*** (20 ed.). University of California, San Francisco: El manual moderno.
- ✍ García CB. (2009). ***Pubarquia. Adrenarquia. Hirsutismo.*** Rev Pediatr Aten Primaria. Publicado en internet [http://www.pap.es/Empty/PAP/front/Articulos/Imprimir/\\_OrCjUxDG4cqGgSAci1KPVnbYnDYF8gt0PEyNoQYRdVo](http://www.pap.es/Empty/PAP/front/Articulos/Imprimir/_OrCjUxDG4cqGgSAci1KPVnbYnDYF8gt0PEyNoQYRdVo)
- ✍ Garrido N., Meseguer M. (2008). ***Bancos de semen.*** Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J., Cobo A., Romero J., De los Santos MJ., Pellicer A. 3ra ed. Mc. Graw-Hill Interamericana. Cap. 6. Págs. 47-51.
- ✍ Garrido N., Meseguer M., Muriel L. (2008). ***La fragmentación del ADN en los espermatozoides.*** Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J., Cobo A., Romero J., De los Santos MJ., Pellicer A. 3ra ed. Mc. Graw-Hill Interamericana. Cap. 11. Págs. 89-97.
- ✍ Genivity Clínica de fertilidad. (2013). ***Novedosa técnica para la selección espermática en el factor masculino.*** Publicado en <http://www.iech.com.mx/novedosa-tecnica-de-seleccion-espermatologica.html>
- ✍ Gillan L., Evans G., Maxwell WM. (2006). ***Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential.*** Theriogenology. No. 63. Págs. 445-457.
- ✍ Góngora RA., Fontanilla RD. (2010). ***La fragmentación de ADN espermático, influencia sobre las técnicas de reproducción asistida y la calidad embrionaria.*** Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. Vol. 61 No. 2. Págs. 160-164.
- ✍ Góngora RA., Sánchez GS., Cubillos GS., Cuneo PS. (2011). ***Fragmentación del ADN del espermatozoide y su influencia en la fertilidad de la pareja.*** Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción. No. 3. Vol. 3. Págs. 105-111.

- ✍ González MC., Gozávez J., Roy R. (2012). **Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells.** International Journal of Molecular Sciences. No. 13. Págs. 14026-14052.
- ✍ Gozávez BJ., Caballero PP., López FC., Fernández JL., Núñez CR. (2008). **Fragmentación del ADN espermático.** Rev Int Androl. Vol. 6. No. 3. Págs. 193-209.
- ✍ Gozávez J., Cortés GE., Núñez R., Fernández JL., Caballero P., López FC., Holt WV. (2009). **A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors.** Fertility and Sterility. Vol. 92, No. 6. Págs. 1915-1919.
- ✍ Grunewald S., Reinhardt M., Blumenauer V., Said TM., Agarwal A., Abu FH., Juergen HG., Paasch U. (2009). **Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility.** Fertility and Sterility. Vol. 92, No. 2.
- ✍ Grunewald S., Sharma R., Paasch U., Juerguen HG., Agarwal A. (2009). **Impact of Caspase Activation in Human Spermatozoa.** Microscopy Research and Technique. Vol. 72. Págs. 878–888.
- ✍ Guijaro A. (2010). **¿Qué es un Banco de semen y de dónde obtienen el semen?** Obtenido de <http://librotambre.blogspot.mx/2010/11/que-es-un-banco-de-semen-y-de-donde.html>.
- ✍ Guyton AC., Hall JE. (2011). **Tratado de Fisiología médica** (12 ed.). Elsevier Saunders.
- ✍ Halosperm® (2005). **Manual del usuario.** Biotec Indas Laboratorios.
- ✍ Holoch P., Wald M. (2011). **Current options for preservation of fertility in the male.** Department of Urology, University of Iowa, Iowa City, Iowa. Fertility and Sterility. Vol. 96, No. 2.
- ✍ Hoogendijk CF., Kruger TF., Bouic PD., Henkel RR. (2009). **A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry.** Fertility and Sterility. Vol. 91, No. 4.
- ✍ Hori T., Odaka S., Oba H., Mizutani T., Kawakami E., Tsutsui T. (2006). **Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa.** Theriogenology. Vol. 68. No. 10. Págs. 1055-1061.

- 🔗 Hosseinifar H., Sabbaghian M., Chehrazi M., Modarresi T., Jannat AF., Sadighi GM. (2013). **Assessment of Deoxyribonucleic Acid Fragmentation Index, Testicular Volume, Semen Parameters, and Hormone Profile in Gonadotropin-treated Men With Hypogonadotropic Hypogonadism.** UROLOGY. Vol. 82. No. 6. Págs. 1291-1295.
- 🔗 Hourcade JD., Pérez CM., Fernández GR., Pintado B., Gutiérrez AA. (2010). **Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage.** Reproductive Biology and Endocrinology. Vol. 8. No. 9.
- 🔗 Instituto Bernabeu. (2010). **Fragmentación de ADN en espermatozoides, TUNEL.** Publicado en <https://www.flickr.com/photos/institutobernabeu/5208224925>.
- 🔗 INVIDA-IVI. (2013). **Banco de semen, fertilidad congelada.** La revista de IVI N° 11 · julio 2013.
- 🔗 Isachenko E., Isachenko V., Weiss JM., Kreienberg R., Katkov I., Schulz., Lulat AG., Risopatrón MJ., Sánchez R. (2008). **Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose.** Society for Reproduction and Fertility. No. 136. Págs. 167-173.
- 🔗 IVI. (2013). **IVI MÉXICO. Clínica de reproducción asistida en México.** Obtenido de <http://www.ivi-fertilidad.com/es-mx/pacientes/preguntas-frecuentes/causas-infertilidad/>
- 🔗 Jahnukainen K., Ehmcke J., Schlatt S. (2011). **Testicular function and fertility preservation in male cancer patients.** Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. No. 25 Págs. 287–302.
- 🔗 Jin LJ., Eun ST., Hun SS., Won BC., Ki YT., Ryul LD. (2010). **Effect of liquid nitrogen vapor storage on the motility, viability, morphology, deoxyribonucleic acid integrity, and mitochondrial potential of frozen-thawed human spermatozoa.** Fertility and Sterility. Vol. 94. No. 7. Págs. 2736-2741.
- 🔗 Jun CH., Yeon CD., Young CS., Hyun KJ., Youn KG., Seok LJ., Sun LH., Hee KM., Roh S. (2011). **Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program.** Clin Exp Reprod Med. Vol. 38. No. 1. Págs. 10-17.
- 🔗 Kim HH., Funaro M., Mazel S., Goldstein M., Schlegel P., Paduch Darius A. (2013). **Flow cytometric characterization of apoptosis and chromatin damage in spermatozoa.** Reproductive BioMedicine Online. No. 26. Págs. 393– 395.

- ☞ Kovács T., Békési G., Fabian A., Rakosy Z., Horvath G., Matyus L., Balazs M., Jenei A. (2008). **DNA Flow Cytometry of Human Spermatozoa: Consistent Stoichiometric Staining of Sperm DNA Using a Novel Decondensation Protocol**. *Cytometry Part A*. Núm 73A. Págs. 965 – 970.
- ☞ La Vignera S., Condorelli RA., Vicari E., Calogero AE. (2012) **Negative Effect of Increased Body Weight on Sperm Conventional and Nonconventional Flow Cytometric Sperm Parameters**. *Journal of Andrology*. Vol. 33, No. 1.
- ☞ Leimgruber C. (s.f). **Análisis de la proliferación y Apoptosis**. Centro de microscopia electrónica. Universidad de Córdoba. Publicado en <http://cmefcm.uncor.edu/clases/Apoptosis.pdf>.
- ☞ Lizarbe IM. (2007). **El suicidio y la muerte celular**. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Vol. 101. No. 2.
- ☞ Lukanov TH., Lichev DI., Konova EI., Emin AI., Ayvazova NP., Velkova AV., Roussev RG. (2009). **Flow cytometric measurement of sperm nuclear DNA fragmentation in infertile men with normal standard sperm parameters**. *JMH*. Vol. 6. No. 1. Págs. 50-55.
- ☞ Mangiarini A., Paffoni A., Restelli L., Ferrari S., Guarneri C., Ragni G., Somigliana E. (2013). **Specific sperm defects are differentially correlated with DNA fragmentation in both normozoospermic and teratozoospermic subjects**. *Andrology*, 2013, No. 1, Págs. 838 – 844.
- ☞ Meamar M., Zribi N., Cambi M., Tamburrino L., Marchiani S., Filimberti E., Grazia MF., Biggeri A., Menezo Y., Forti G., Baldi E., Muratori M. (2012). **Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica***. *Fertility and Sterility*. Vol. 98. No 2.
- ☞ Meseguer M., Ruiz A., Garrido N., Zuzuarregui JL., Reis S., Escudero E., Pellicer A., Remohí J. (2002). **Congelación y banco de semen: métodos, organización e indicaciones**. *Reproducción Humana*. Remohí J., Pellicer A., Simon C., Navarro J. 2da ed. Mc. Graw-Hill Interamericana. Cap. 44. Págs. 363-371.
- ☞ Morales R., Lledó B., Ortiz J., Rodríguez AD., Fabregat A., Bernabeu R. (2007). **Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad**. *Revista iberoamericana de fertilidad*. Vol. 24. No. 5. Págs. 304-313.
- ☞ Muratori M., Marchiani S., Tamburrino L., Tocci V., Failli P., Forti G. Baldi E. (2008). **Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters**. *Human Reproduction*. Vol. 23, No.5. Págs 1035–1043.

- ✎ Muratori M., Tamburrino L., Tocci V., Constantino A., Marchiani S., Giachini C., Laface I., Krausz C., Meriggiola MC., Forti G., Baldi E. (2010). ***Small Variations in Crucial Steps of TUNEL Assay Coupled to Flow Cytometry Greatly Affect Measures of Sperm DNA Fragmentation.*** Journal of Andrology. Vol. 31, No. 4. Págs. 336-345.
- ✎ Nohales M., Remohí J., Pellicer A., Garrido N. (2012). ***Factores moleculares de infertilidad en el espermatozoide más allá del Manual de la Organización Mundial de la Salud de 2010.*** Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana. Vol. 29. No. 2.
- ✎ Núñez CR., Cortés GS., Gago GM., Pueyo CA., Peramo MB., Caballero PP. (2007). ***Análisis microbiológico del semen de los varones en estudio de infertilidad.*** Revista Int. de Andrología, Vol 5. No 3.
- ✎ Oliva HJ., Marcos GM. (2010). ***Efectos de la descongelación-lavado sobre la motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides de baja calidad.*** Revista Int. de Andrología. Vol. 8. No. 1. Págs. 14-20.
- ✎ Ortega GA. (2012). ***Análisis de la fragmentación del ADN espermático de muestras del banco de semen y su capacidad de fertilización en técnicas de reproducción asistida.*** Tesis de licenciatura. UNAM.
- ✎ Ortega LL., Olaya VE., López DP., Gabriel SA., Orozco GI., Núñez CR., Caballero PP. (2010). ***Comparación entre el test de fragmentación de ADN espermático mediante la técnica de SCD y el índice de vitalidad medida con el test de naranja de acridina.*** Rev Int Androl. Vol. 8. No. 3. Págs. 114-121.
- ✎ Paasch U., Grunewald S., Agarwal A., Jürgen HG. (2004). ***Activation pattern of caspases in human spermatozoa.*** Fertility and Sterility. Vol. 81. No. 1. Págs. 802-809.
- ✎ Paasch U., Sharma KR., Gupta KA., Grunewald S., Mascha JE., Thomas JA., Glander J., 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. Vol. 71. Págs. 1828 – 1837.
- ✎ Partyka A., Nizańskib W., Łukaszewicz E. (2010). ***Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry.*** Theriogenology. No. 74. Págs 1019-1027.
- ✎ Petyim S., Neungton C., Thanaboonyawat I., Laokirkkiat P., Choavaratana R. (2014). ***Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation.*** J Assist Reprod Genet.

- ⌘ Pouly L., Brugnon F., Pons H., Dejardin M., Tartiere M., Gremeau S., Dejou L., Janny L. (2014). **Donación de gametos y de embriones**. EMC - Ginecología-Obstetricia. Vol 50. No. 1
- ⌘ Rafaela RM. (2007). **Infertilidad masculina. Causas, diagnóstico y tratamiento**. Ámbito farmacéutico. Divulgación sanitaria, Vol. 26 No 7, 70-75.
- ⌘ Rahimipour M., Reza AT., Anvari M., Sarcheshmeh AA., Omid M. (2013). **Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice**. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. Vol. 170. Págs. 423–428.
- ⌘ Rahimipour M., Reza AT., Anvari M., Sarcheshmeh AA., Omid M. (2014). **Saccharin consumption increases sperm DNA fragmentation and apoptosis in mice**. Iranian Journal of Reproductive Medicine. Vol. 12. No. 5. Págs. 307-312.
- ⌘ Rennemeier C., Frambach T., Hennicke F., Dietl J., Staib P. (2009). **Microbial quorum-sensing molecules induce acrosome loss and cell death in human spermatozoa**. Infection and Immunity. Vol. 77. No. 11. Págs. 4990–4997.
- ⌘ Revel A., Revel VS. (2008). **Pediatric fertility preservation: Is it time to offer testicular tissue cryopreservation?**. Molecular and Cellular Endocrinology. Vol. 282. Págs. 143 - 149.
- ⌘ Riel JM., Yamauchi Y., Huang TT., Grove J., Ward MA. **Short-Term Storage of Human Spermatozoa in Electrolyte-Free Medium Without Freezing Maintains Sperm Chromatin Integrity Better Than Cryopreservation**. Biology of reproduction. No. 85. Págs. 536–547.
- ⌘ Robinson L., Gallos ID., Conner SJ., Rajkhowa M., Miller D., Lewis S., Kirkman BJ., Coomarasamy A. (2012). **The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis**. Human Reproduction. Andrology.
- ⌘ Robles V., Pastor FM. (2013). **Flow Cytometric Methods for Sperm Assessment**. Spermatogenesis: Methods and Protocols Chapter 16. Methods in Molecular Biology. Vol. 927.
- ⌘ Rodríguez B., López FC., Núñez CR., Caballero P., Martínez MM., Alonso C., Martín B., Rodríguez AB., García PA., Gozávez J. (2012). **Varicocele, leucocitospermia y su impacto en la fragmentación del ADN espermático**. Rev Int Androl. Vol. 10. No. 1. Págs. 3-10.



- ✍ Rougier N., Uriondo H., Papier S., Checa MA., Sueldo C., Álvarez SC. (2013). ***Changes in DNA fragmentation during sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection over time.*** *Andrology*. Vol. 100. No. 1. Págs. 69-74.
- ✍ Said MT., Gaglani A., Agarwal A. (2010). ***Implication of apoptosis in sperm cryoinjury.*** *Reproductive BioMedicine Online*. Vol. 21. Págs. 456 – 462.
- ✍ Sakkas D., Álvarez JG. (2011). ***Fragmentación del ADN espermático: mecanismos de origen, repercusión en los resultados reproductivos y análisis.*** *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. 3(4):160-175.
- ✍ Sarabia L., Munuce MJ. (2011). ***Nuevos valores para el espermograma OMS 2010.*** *Rev Med Chile*. No. 139. Págs. 548-549.
- ✍ Saritha KR., Bongso A. (2001). ***Comparative Evaluation of Fresh and Washed Human Sperm Cryopreserved in Vapor and Liquid Phases of Liquid Nitrogen.*** *Journal of Andrology*. Vol. 22. No. 5. Págs. 857-862.
- ✍ Serzedello TP., Pimenta BR., Montagnini SD., Adelaide CM., Schor N., Pereira CA. ***Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia.*** *Fertility and Sterility*. Vol. 86, No. 3. Págs. 597 - 600.
- ✍ Shaha C., Tripathi R., Prasad MD. (2010). ***Male germ cell apoptosis: regulation and biology.*** *Philosophical transactions The royal society B*. Vol. 365, No. 1546. Págs. 1501-1515.
- ✍ Sharma RK., Sabanegh E., Mahfouz R., Gupta S., Thiyagarajan A., Agarwal A. (2010). ***TUNEL as a Test for Sperm DNA Damage in the Evaluation of Male Infertility.*** *UROLOGY* 76 (6), 2.
- ✍ Sherwood L. (2011). ***Fisiología humana. De las células a los sistemas*** (7 ed.). Universidad de West Virginia: CENGAGE Learning.
- ✍ Stuth D. (2007). ***Espermatogénesis.*** Publicado en <http://espermatogenesis.blogspot.mx/>.
- ✍ Tamburrino L., Marchiani S., Montoya M., Elia MF., Natali L., Cambi M., Forti G., Baldi E., Muratori M. (2012). ***Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage.*** *Asian Journal of Andrology*. No. 14. Págs. 24-31.
- ✍ Thompson LK., Fleming SD., Aitken RJ., De Iuliis GN., Zieschang JA., Clark AM. (2009). ***Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly***



- mediated by oxidative stress rather than apoptosis.* Human Reproduction. Vol. 24. No. 9. Págs. 2061-2070.
- ↳ Torres P, Peinado I, De la Orden M, Romeu M, Romeu A (2009). ***Estudio de la calidad seminal y tasa de gestación tras inseminación artificial y FIV con semen de donante. ¿Influye la elección del banco?*** Fertilidad. Vol. 26. Págs. 7-13.
- ↳ Tresguerres JA. (2005). ***Fisiología Humana*** (3 ed.). Universidad Computense de Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- ↳ Velázquez CG. (2009). ***Fisiología de la reproducción humana.*** Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción. Vol 1. No. 4. Págs 115-130.
- ↳ Vendrell X., Ferrer M., García ME., Muñoz P., Triviño JC., Calatayud C., Rawe VY., Ruiz JM. (2014). ***Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients.*** Reproductive BioMedicine Online. No. 28. Págs. 492-502.
- ↳ Vutyavanich T., Lattiwongsakorn W., Piromlertamorn W., Samchimchom S. (2012). ***Repeated vitrification/warming of human sperm gives better results than repeated slow programmable freezing.*** Asian Journal of Andrology. No. 14. Págs. 850-854.
- ↳ WHO. (2010). ***WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*** (5ª ed.).
- ↳ Wolf DP., Patton PE., Burry KA., Kaplan PF. (2001). ***Intrauterine insemination-ready versus conventional semen cryopreservation for donor insemination: a comparison of retrospective results and a prospective, randomized trial.*** Fertility and Sterility. Vol. 76. No. 1. Págs. 181-185.
- ↳ Wünderlich K., Paasch U., Leicht M., Jürgen G. (2006). ***Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation – an immunoblot study.*** Cell and Tissue Banking. No. 7. Págs 81 – 90.
- ↳ Yan LH., Hong Z., Gou YM., Yi X., Chao S., Cui XD., Yang L., Yuan YL., XinZ., Xiao MF., Shuai XU., Lu G., Xin Z. (2013). ***Simulated Microgravity Conditions and Carbon Ion Irradiation Induce Spermatogenic Cell Apoptosis and Sperm DNA Damage.*** Biomed Environ Sci. Vol. 26. No. 9. Págs. 726-734.
- ↳ Yogev L., Kleiman SE., 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. Vol. 25. No. 5. Págs. 1097–1103.

✍ Young K., Robbins W., Xun L., Elashoff D., Rothmann S., Perreault S. (2003). *Evaluation of Chromosome Breakage and DNA Integrity in Sperm: An Investigation of Remote Semen Collection Conditions.* Journal of Andrology. Vol. 24. No. 6. Págs. 853-861.

✍ Zini A., Jamal W., Cowan L., Al-Hathal N. (2011). *Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? A systematic review.* J. Assist. Reprod. Genet. 28, 391–397.

✍ Zorn B., Golob B., Ihan A., Kopitar A., Kolbezen M. (2012). *Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential.* J Assist Reprod Genet. No. 29. Págs. 357–364.

✍ Zribi N., Feki CN., Ben AF., Elleuch H., Sellami A., Gargouri., Rebai T., Fakhfakh F., Ammar KL. (2012). *Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity.* Cryobiology. No. 65. Págs. 326–331.