



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN  
ESPÉRMATICO EN MUESTRAS CRIOPRESERVADAS  
POR VITRIFICACIÓN Y ULTRAVITRIFICACIÓN

Tesis para obtener el título de  
BIÓLOGO (A)

PRESENTA:  
MONSERRAT DOMÍNGUEZ DOMÍNGUEZ

TUTOR: M. en C. JUAN CARLOS FLORES ALONSO



PUEBLA, PUE., NOVIEMBRE 2014

**“Esta investigación fue realizada con apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”**



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y a la vida por dejarme llegar a esta etapa de mi vida.

Al Centro de investigación Biomédica de Oriente, por todas las facilidades para la realización de este trabajo, en especial al Químico Luis por todo su apoyo durante la estancia del Doctor Juan Carlos en Francia.

Al Dr. Juan Carlos Flores Alonso por permitirme ser su alumna y dejarme trabajar en su laboratorio, por su tiempo dedicado a la elaboración de este proyecto, por todos sus consejos y por incentivar me a ser mejor profesionista cada día.

A la Dra. Rosalinda Reyes Luna por su tiempo dedicado para la revisión y mejora de este trabajo, por sus consejos y apoyo.

A la M. en C. Ubaldo Quiroz López por revisar la tesis y sus recomendaciones.

A todos mis profesores de la Escuela de Biología por sus enseñanzas y formarme como Bióloga, a ser mejor profesionista y persona cada día.

A mis amigos por toda su amistad, apoyo y motivación.

A mi familia en general, por su apoyo y comprensión, por incentivar me a ser mejor persona cada día, sin ustedes nunca lo hubiera logrado. Los amo a todos.

## DEDICATORIAS

### A MI FAMILIA

**A mis padres,** Esther Domínguez Hernández y Juan Sebastián Domínguez Díaz, por darme la vida y por la mejor herencia que es una carrera profesional, por sus valores inculcados y por todo su apoyo incondicional. Por el sacrificio brindado por un futuro mejor para mis hermanos y para mí, pero sobre todo por amarnos tanto y creer en mí.

**A mis hermanos,** Adrián por todo tu apoyo, cariño y ayuda económica. A Karlita y Sandí, por todo su paciencia, comprensión, apoyo y ayuda; porque siempre seremos las tres mosqueteras.

**A mis abuelos,** Fidencio, en donde quiera que estés, sé que intercedes por nosotros. A mi Abue Angelita por su paciencia, cariño, comprensión y apoyo, por enseñarme las mejores cosas de la vida y por los valores inculcados. Hay mucho que aprender de ustedes son un ejemplo de vida y unas grandes personas

**A mis tías,** Galdí, Alí y a su esposo el Ingeniero Miguel Terán, por su cariño, apoyo incondicional y sus consejos, por motivarme ser mejor persona cada día. En especial a mi tía Fabi, por su cariño y confianza, por creer en mí. Por todo su apoyo tanto moral como económico, sin usted nunca lo hubiera logrado.

**A mis primos,** que más que mis primos son mis hermanos por la todo el tiempo convivido y por las cosas que unen. Robe, Aldo, Erick, Alexis y Ximena. Por su apoyo, cariño, paciencia y comprensión.

**A mis amigos,** Mari, Ale y Alain, por su amistad porque en su tiempo compartimos momentos maravillosos.

## RESUMEN

La criopreservación de gametos es una de las metodologías empleadas cuando la fertilidad del paciente se ve amenazada por tratamientos quimioterapéuticos o radiológicos. Diversos estudios han mostrado que el uso de espermatozoides criopreservados puede generar abortos espontáneos y/o anomalías en los productos obtenidos. Hasta la fecha, existe poca información acerca de los efectos que tiene la congelación sobre la calidad del ADN del espermatozoide. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la integridad del ADN espermático en muestras criopreservadas por diferentes esquemas de congelación y medios crioprotectores. A muestras de semen de donantes, se les analizó la concentración, viabilidad, morfología, movilidad celular y actividad metabólica. También se analizó la integridad del ADN a través de tinción anaranjado de acridina y prueba cometa. Posteriormente las muestras fueron congeladas utilizando dos técnicas de congelación: Vitrificación y ultravitrificación, en ambas técnicas, las muestras fueron mezcladas con y sin crioprotector a base de yema de huevo y etilenglicol. Después de un mes de congelación en nitrógeno líquido se volvieron a analizar las variables de la espermátoscopia y las pruebas de fragmentación de ADN espermático. Los resultados de este proyecto arrojaron que la congelación, independientemente de la técnica y del medio crioprotector, disminuye significativamente la viabilidad, la movilidad, la morfología y aumenta la actividad metabólica de las células y también induce a tasas altas de fragmentación del ADN espermático. Sin embargo, se observó que las alteraciones sobre la viabilidad y movilidad fueron menores cuando fueron mezcladas con el crioprotector en una proporción 1:1, tanto para vitrificación y ultravitrificación. Los resultados sugieren que la congelación induce alteraciones en los espermatozoides e incrementa la fragmentación del ADN espermático; por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos esquemas de criopreservación celular.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	9
1.1 Infertilidad.....	9
1.2 Infertilidad masculina.....	9
1.3 Integridad del ADN espermático.....	12
1.4 Fragmentación de ADN espermático.....	13
1.4.1 Fragmentación del ADN durante el empaquetamiento de la cromatina...14	
1.4.2 Fragmentación del ADN espermático por apoptosis.....	14
1.4.3 Fragmentación del ADN espermático por la producción de especies reactivas de oxígeno.....	14
1.4.4 Leucocitospermia.....	15
1.4.5 Tabaquismo.....	16
1.4.6 Interferencia iatrogénica.....	17
1.4.7 Daños en el ADN espermático en pacientes con cáncer.....	18
1.4.8 Las drogas y radiación.....	18
1.5 Técnicas empleadas para en el diagnóstico de la fragmentación de ADN en espermatozoides.....	19
1.5.1 Ensayo TUNEL.....	20
1.5.2 Ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA).....	21
1.5.3 Análisis in situ Nick translation (ISNT).....	21
1.5.4 Prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD).....	22
1.5.6 Prueba cometa.....	22

1.5.7 Prueba de fragmentación de ADN con tinción Anaranjado de Acridina...	23
1.6 Técnicas de reproducción asistida.....	24
1.6.1 Inseminación artificial (IA).....	24
1.6.2 Fertilización in vitro (FIV).....	25
1.6.3 Inyección intracitoplasmática.....	26
1.7 Criopreservación.....	27
2. Antecedentes.....	31
3. Justificación.....	33
4. Objetivos.....	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
5. Hipótesis.....	36
6. Material y métodos.....	37
6.1 Obtención de la muestra.....	37
6.2 Espermabioscopia.....	37
6.3 Concentración celular de la muestra.....	38
6.4 Movilidad.....	38
6.5 Tratamiento de la muestra.....	39
6.6 Determinación de la viabilidad de los espermatozoides.....	39
6.7 Actividad Metabólica.....	39
6.8 Análisis de la morfología de los espermatozoides.....	40

6.9 Criopreservación de las muestras.....	40
6.10 Determinación de la fragmentación de los espermatozoides por microscopía de fluorescencia.....	42
6.11 Evaluación de la fragmentación de los espermatozoides por prueba cometa.....	42
7. Resultados.....	44
7.1 Espermatobioscopia de los eyaculados obtenidos.....	44
7.2 Efecto de los métodos de congelación y de los medios crioprotectores sobre la movilidad celular.....	45
7.3 Viabilidad celular.....	46
7.4 Efecto de la congelación sobre la morfología de los espermatozoides.....	47
7.5 Determinación de la actividad metabólica por reducción del indicador rezasurin.....	48
7.6 Efecto de la criopreservación sobre la integridad del ADN del espermatozoide.....	49
7.7 Asociación entre la morfología y la fragmentación del ADN espermático mediante prueba cometa.....	51
7.8 Asociación entre el aumento de la actividad metabólica y la fragmentación del ADN espermático mediante prueba cometa.....	52
8 .Discusión.....	55
9. Conclusión.....	60
10. Perspectivas.....	62
11. Trabajos citados.....	63
12. Anexos.....	73

## Índice de figuras

Figura 1. Descripción morfológica de las partes de un espermatozoide.....	10
Figura 2. Modelo hipotético bucles de rosquilla.....	11
Figura 3. Ensayo Tunel a través de microscopía de flourescencia.....	20
Figura 4. Ensayo SCSA donde la formación del halo representa ADN normal.....	21
Figura 5. Ensayo SCD microscopía de campo claro.....	22
Figura 6. La formación de cometas indica presencia de ADN fragmentado.....	23
Figura 7. Tinción anaranjado de acridina.....	24
Figura 8. Introducción de espermatozoides dentro del tracto reproductor fenemino.....	25
Figura 9. Espermatozoides rodeando al óvulo, con el objetivo de iniciar el proceso de fertilización.....	26
Figura 10. Inyección intracitoplasmática del espermatozoide.....	27
Figura 11. Cuadrantes de la cámara de Neubahuer.....	38
Figura 12. Anormalidades que presentan los espermatozoides humanos.....	40
Figura 13. Efecto de la vitrificación y ultravitrificación sobre la movilidad celular.....	45
Figura 14. Efecto de los diferentes esquemas de crioprotección sobre la viabilidad celular.....	46
Figura 15. Efecto de los diferentes esquemas de crioprotección sobre la morfología del espermatozoide.....	47

Figura 16. Efecto del crioprotector y de los métodos de congelación sobre la morfología de los espermatozoides.....	48
Figura 17. Efecto de los diferentes esquemas de criopreservación sobre la actividad metabólica de los espermatozoides.....	49
Figura 18. Efecto de los diferentes esquemas de crioprotección sobre la integridad del ADN (Tinción con anaranjado de acridina).....	50
Figura 19. Efecto de los diferentes esquemas de crioprotección sobre la integridad del ADN (Prueba cometa).....	50
Figura 20. Asociación entre la morfología de células normales y la fragmentación de ADN espermático, en los diferentes medios crioprotectores congelados mediante vitrificación.....	51
Figura 21. Determinación de la asociación de las células morfológicamente normales y la fragmentación de ADN espermático, preservados bajo diferentes medios crioprotectores y congelados por ultravitrificación.....	52
Figura 22. Asociación entre el aumento de la actividad metabólica y los índices altos de fragmentación de ADN espermático en diferentes esquemas de crioprotección preservados por vitrificación.....	53
Figura 23. Efecto del aumento de la actividad metabólica sobre la fragmentación de ADN espermático en diversos medios crioprotectores y congelados por ultravitrificación.....	54

## **Índice de tablas**

Tabla 1. Valores de referencia, propuesto en 1999 y 2010 del límite de referencia inferior (LRI) en espermiograma.....	37
Tabla 2. Diseño del experimento, espermatozoides frescos y congelados en diferentes medios crioprotectores.....	41
Tabla. 3. Promedio y error estándar de los eyaculados obtenidos comparados con el límite de referencia inferior establecido por el manual de la OMS.....	44

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AI	Inseminación Artificial
AO	Anaranjado de Acridina
CU	Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
FHS	Hormona folículo estimulante
FIV	Fertilización <i>In Vitro</i>
HSPM	Medio de preservación de espermatozoides humanos
ICSI	Inyección intracitoplasmática
ISNT	Ensayo In Situ Nick Traslation
IUI	Inseminación artificial intrauterina
LH	Hormona luteinizante
NL <sub>2</sub>	Nitrógeno líquido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PROH	Propanodiol
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCD	Prueba de Dispersión de la Cromatina
SCSA	Ensayo de la Estructura de la Cromatina en Espermatozoides
SOD	Superóxido dismutasa

TUNEL Labelling	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase -Tdt-Mediated Nick-End
TYB	TEST yolk buffer
ZN	Zinc

# ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPÉRMATICO EN MUESTRAS CRIOPRESERVADAS POR VITRIFICACIÓN Y ULTRAVITRIFICACIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Infertilidad

La infertilidad es una alteración en la salud humana que acarrea consecuencias sociales, psicológicas y económicas. Una pareja en edad reproductiva puede ser considerada infértil si después de dos años de relaciones sexuales regulares, sin el uso de algún método anticonceptivo, la mujer no llega a estar embarazada (Mascarenhas, *et al.*, 2012). La prevalencia de la infertilidad se ha estimado que ocurre en aproximadamente del 20 al 35% de las parejas, de los cuales más del 40% de los casos son atribuidos a factores masculinos (Massart, *et al.*, 2012).

### 1.2. Infertilidad masculina

Un número de etiologías han sido identificadas como posibles causas de la infertilidad masculina y entre las cuales se incluyen: mutaciones genéticas, aneuploidías, enfermedades infecciosas, oclusión de los conductos eyaculadores, varicocele, exposición a radiaciones, quimioterapia y disfunción eréctil (Ollero, *et al.*, 2001). Sin embargo, al menos el 30% de los casos de infertilidad masculina aún no se diagnostican (Nieschlag, 2000).

Durante la última década, un área de investigación que ha sido estudiada ampliamente, como una posible causa de infertilidad masculina, es la integridad del ADN en el núcleo del espermatozoide maduro eyaculado (Sakkas, *et al.*, 1999). El daño del ADN puede llevar a la inducción de mutaciones que pueden pasar a la próxima generación, a la muerte celular o incluso dar como resultado infertilidad masculina. La integridad del ADN puede llegar a ser aún más importante como indicador de la salud del espermatozoide (Hughes, *et al.*, 1999) y establecer las probabilidades de éxito cuando son utilizados en técnicas de reproducción asistida (Horta, *et al.*, 2011).

### 1.3 Integridad del ADN espermático

La espermatogénesis en mamíferos es un proceso complejo y único que implica cambios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos que transforman un grupo de espermatogonias diploides en espermatozoides haploides completamente diferenciados con un núcleo condensado, acrosoma y flagelo (ver figura 1). La espermatogénesis se caracteriza por la división de etapas bien definidas: espermatogoniogénesis, espermiogénesis y espermiación (D'Occhio, *et al.*, 2007).

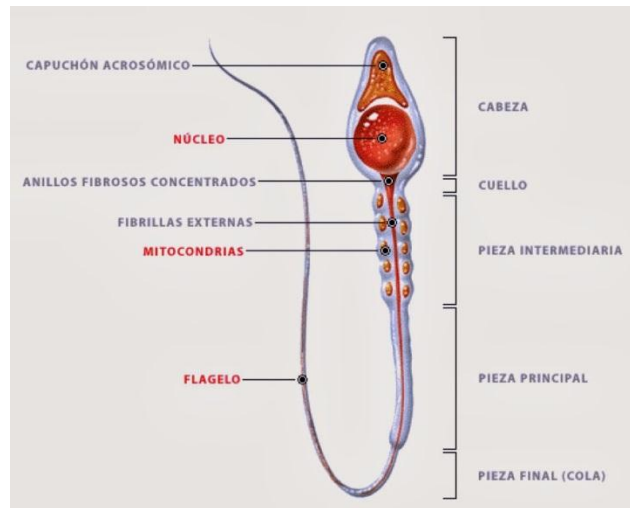


Fig. 1. Descripción morfológica de las partes de un espermatozoide, tomada del manual de embriología humana (2014).

La espermatogoniogénesis consta de divisiones mitóticas que permiten la proliferación y el mantenimiento de las espermatogonias (Senger, 1999). Las espermatogonias se someten a la meiosis para formar espermatocitos primarios y luego en espermatocitos secundarios, que se diferenciarán en espermátidas. Las espermátidas se pueden dividir en tres categorías: las primeras espermátidas se caracterizan por poseer núcleos redondos, las espermátidas intermedias tienen núcleos alargados, y las espermátidas maduras adquieren núcleos condensados (Dadoune, 2003). Cada uno de estos pasos representa un elemento clave en el proceso de la espermatogénesis. Los defectos que se producen en cualquiera de ellos puede resultar en el fallo de todo el proceso y conducir a la producción de

espermatozoides defectuosos y a la reducción o ausencia de la producción de espermatozoides (Kretser, *et al.*, 1998).

La condensación de la cromatina comienza durante la espermiogénesis, cuando las histonas son reemplazadas por primera vez por las proteínas de transición y finalmente por protaminas (Grimes, *et al.*, 1997). La compactación final de la cromatina de los espermatozoides es muy alta con respecto a la cromatina de las células somáticas (Ward and Coffey, 1991), tal compactación le proporciona estabilidad al ADN y una morfología característica al gameto masculino (Evenson, *et al.*, 1986). Durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo, las protaminas forman enlaces disulfuro inter e intramoleculares y como resultado, la cromatina de espermatozoides está completamente condensado (Garcia-Macias, *et al.*, 2006).

El ADN de espermatozoide interactúa con protaminas de una manera única, la cual consiste en el enrollamiento de ADN en subunidades toroidales, también conocido como bucles de rosquilla, que contiene alrededor de 50 kb de ADN (Ver figura 2). Al terminar la espermiogénesis puede haber hasta 50.000 estructuras toroidales envasados dentro del núcleo de espermatozoide (Balhorn, *et al.*, 1999).

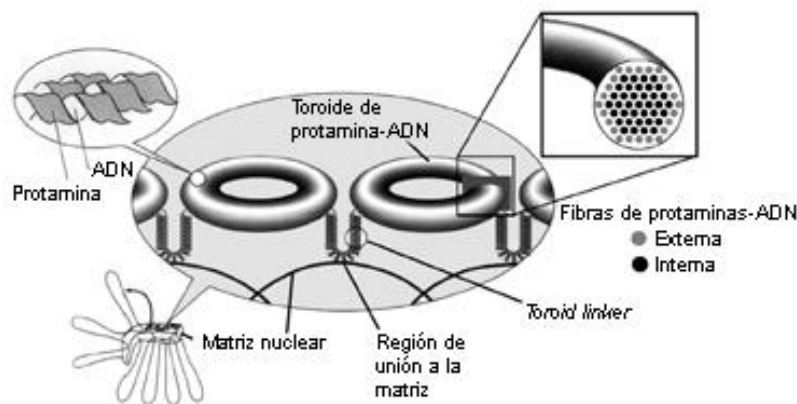


Fig. 2. Modelo hipotético bucles de rosquilla. El complejo ADN-protaminas se organiza en círculos concéntricos. Los círculos de un bucle se pliegan en una estructura toroidal, en la cual los complejos ADN-protaminas están unidos por fuerzas de Van der Waals. Cada toroide representa un bucle de ADN unido a la matriz nuclear. Extraído de Balhorn y colaboradores (1999).

Las protaminas, son proteínas básicas con tramos largos de residuos de arginina; se unen al ADN longitudinalmente a lo largo de una de las ranuras, con cada residuo de arginina cargado positivamente se une con otro residuo cargado negativamente del esqueleto fosfodiéster del ADN con el objetivo de neutralizar las cargas. Esto transforma el ADN polianiónico en un polímero neutro, y los complejos de ADN-protamina se unen entre sí por fuerzas de Van der Waals de forma lineal. Y es así como en la espermiogénesis ocurren la mayor parte de cambios morfológicos, como la formación del acrosoma, la condensación nuclear, un núcleo transcripcionalmente inactivo, desarrollo flagelar y pérdida de la mayoría del citoplasma (Knobil & Neill, 2006; D'Occhio, *et al.*, 2007).

La última etapa de la espermatogénesis se llama espermiación; y ocurre cuando las espermátidas maduras pasan al epitelio germinal, con ayuda de las células de Sertoli. Como resultado de la compleja cooperación de los filamentos intermedios y los túbulos citoplasmáticos de las células de Sertoli las espermátidas avanzan a la frontera de la luz del tubo seminífero. Las espermátidas maduras cierran los puentes intercelulares, se desconectan del contacto con el epitelio germinal y se convierten en células libres, que ahora se llama espermatozoides (Holstein, *et al.*, 2003).

La espermatogénesis es un largo proceso, pero en términos de calidad es deficiente ya que solo el 12% de los espermatozoides son altamente viables para iniciar el proceso de reproducción (Holstein, *et al.*, 2003). La producción de espermatozoides se puede ver reflejada con la concentración y la calidad. Por lo que se han ideado diferentes categorías: azoospermia (Ausencia de espermatozoides en el eyaculado), oligozoospermia (<15 millones/mL), teratozoospermia (Morfología normal menor de 4%, astenozoospermia (Movilidad progresiva (a+b) menor de 32%; (Godoy, *et al.*, 2013)

#### 1.4. La fragmentación del ADN espermático

La integridad de la molécula de ADN se asocia con la ausencia de roturas tanto de cadena doble como de cadena sencilla del ADN, o con la presencia de anomalías cromosómicas, como pueden ser las aneuploidías o las reordenaciones genómicas estructurales relacionadas con la infertilidad (Aravindan, *et al.*, 1997). Las evidencias sugieren que las alteraciones en la organización del material genómico de los núcleos espermáticos poseen una correlación negativa con el potencial de fertilidad de los espermatozoides, ya sea *in vivo* o *in vitro* (Spano, *et al.*, 2000). Algunos reportes recientes han indicado que cuando  $\geq 30\%$  de ADN espermático está dañado, el embarazo natural no es posible (Evenson, *et al.*, 2002). Sin embargo, existen diversos estudios que han mostrado que los espermatozoides genéticamente dañados mantienen la capacidad de fertilizar en los procesos de fertilización *in vitro* o cuando se inyectan de manera directa dentro del ovocito (Inyección intracitoplasmática). Sí el ADN del espermatozoide presenta lesiones, puede dar lugar a un desarrollo embrionario anómalo, un fallo de implantación o incluso un aborto en fases más tardías. No obstante, cuando se da la fertilización con un espermatozoide dañado en su ADN, los ovocitos son capaces de reparar el daño del ADN hasta cierto grado (Agarwal y Allamaneni, 2005); pero el efecto biológico de la estructura anormal de la cromatina del espermatozoide depende también de los efectos combinados del nivel de daño de la cromatina en los espermatozoides y la capacidad de los ovocitos para reparar el daño que preexiste (Evenson, *et al.*, 2002).

El mecanismo exacto por el cual surgen las alteraciones de la cromatina o en el ADN de espermatozoides humanos no se conoce con precisión, pero se han propuesto tres teorías principales que pudieran ser el origen del daño al ADN espermático: empaquetamiento de la cromatina espermática, la apoptosis y el estrés oxidativo (Agarwal y Said, 2003).

#### *1.4.1 Fragmentación del ADN durante el empaquetamiento de la cromatina*

El empaquetamiento correcto de la cromatina espermática, requiere de la enzima nucleasa endógena o topoisomerasa II; que crea y liga sitios que facilitan la protaminación durante la espermiogénesis (McPherson y Longo, 1993). Estos sitios se cree que pueden aliviar el estrés de torsión y ayudar al redistribución de la cromatina durante el desplazamiento de histonas por protaminas (McPherson y Longo, 1992). Por lo tanto, la presencia de sitios u orquillas endógenos en los espermatozoides puede indicar anomalías durante la espermiogénesis y un proceso de maduración incompleta (Manicardi, *et al.*, 1995).

#### *1.4.2 Fragmentación del ADN espermático por apoptosis*

La apoptosis es un sistema de muerte celular basada en un mecanismo genético que induce una serie de alteraciones celulares, morfológicas y bioquímicas, que conduce a la célula al suicidio (Nagata, 1997). Este proceso por lo general se lleva a cabo en momentos específicos en el desarrollo embrionario normal, para permitir que la forma definitiva de los tejidos y en la vida adulta con la finalidad de descartar células que ya no tienen una función o tienen una función alterada. Por lo tanto, en el contexto de la reproducción masculina, la apoptosis controla el exceso de producción de gametos masculinos y restringe los niveles de proliferación durante condiciones inadecuadas para el desarrollo del espermatozoide (Agarwal y Said, 2003).

#### *1.4.3 Fragmentación del ADN espermático por la producción de especies reactivas de oxígeno*

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos de origen orgánico e inorgánico, son factores que causan infertilidad bajo dos mecanismos principales (Agarwal, *et al.*, 2006). En primer lugar, los ROS dañan la membrana de los espermatozoides, por lo que se reduce la motilidad y la capacidad de fusionarse con el ovocito. En segundo lugar, los ROS dañan directamente el ADN del espermatozoide, de tal manera que se

compromete la contribución genómica paterna integra para el embrión (Tremellen, 2008). Estos daños en el ADN por medio de estrés oxidativo puede conducir a anomalías en la descendencia, incluyendo el cáncer en la niñez y la acondroplasia (Aitken, *et al.*, 2001a). Sin embargo, los ROS también son importantes en la mediación de la apoptosis, que a su vez se traduce en una elevada frecuencia de roturas de cadena doble y cadena sencilla de ADN (Said, *et al.*, 2004). La integridad del ADN de los espermatozoides de los mamíferos es de vital importancia para la contribución genética a la descendencia paterna normal. El énfasis en la evaluación de la integridad genómica ha aumentado recientemente debido a los informes que se correlacionaron el grado de daño en el ADN con diversos índices de fertilidad, incluyendo las tasas de fertilización, el desarrollo embrionario, la implantación, embarazo y nacimientos de infantes vivos (Agarwal y Allamaneni, 2004).

Por otro lado, existe una variedad de causas que han sido correlacionados con un aumento de los niveles de daño del ADN del espermatozoide, y a su vez, pueden afectar perjudicialmente el estado de la fertilidad masculina. Como puede ser: leucocitospermia, el consumo de cigarrillos, interferencia iatrogénica, las drogas, la radiación, etc. (Agarwal y Tamer, 2003).

#### *1.4.4 Leucocitospermia*

Los leucocitos en general están presentes en la mayoría de los eyaculados y se cree que desempeñan un papel importante en la inmunovigilancia y en la fagocitosis de espermatozoides anormales (Tomlinson, *et al.*, 1992). Sin embargo, el aumento de las concentraciones de leucocitos en el semen indican la presencia de una infección del tracto genital o la inflamación y se ha informado de que se asocia con un aumento en la concentración de células germinales inmaduras (Sigman y Lopes, 1993). Álvarez y colaboradores determinaron presencia de mayor cantidad de espermatozoides con el ADN dañado en las muestras de semen de donantes leucocitospermicos en comparación con donadores sanos ( $39.6 \pm 10.9$  versus  $24.9 \pm 10.2\%$ ,  $P < 0.01$ , Álvarez *et al.*, 2002). Una hipótesis

potencial de estos hallazgos es que leucocitospermia podría ser un marcador de un proceso inflamatorio en el testículo. La presencia de mediadores pro-inflamatorios como las citocinas podrían llevar a alteraciones en la regulación de la espermatogénesis y, posteriormente, a la alteración del ADN espermático (Cohen y Pollard, 1995). Otra explicación posible sería el daño en el ADN espermático inducido por ROS de los leucocitos (Reichart, *et al.*, 2000). Finalmente, es importante señalar que incluso infección sistémica puede afectar a la integridad de los espermatozoides. Esto fue sugerido por el hecho de que durante un episodio de la gripe, hay un aumento en el daño del ADN en el espermatozoide producido durante ese ciclo particular (Evenson, *et al.*, 2000).

#### 1.4.5 Tabaquismo

El humo del cigarrillo tiene propiedades perjudiciales en el proceso de fertilización, ya que su consumo se ha asociado a una reducción global de la calidad del semen y, específicamente, a una reducción en el recuento de espermatozoides y en su motilidad así como un aumento en el número de células con morfología anormal (Kunzle, *et al.*, 2003). También se determinó que el tabaquismo afecta a la integridad del ADN de los espermatozoides. Se ha observado que el daño del ADN espermático fue significativamente mayor en los fumadores en comparación con los no fumadores cuando fueron analizados utilizando los ensayos SCSA y TUNEL ( $P < 0.02$  y  $P < 0.05$ , respectivamente; Potts, *et al.*, 1999a). Los metabolitos liberados de la combustión del tabaco inducen una reacción inflamatoria en el tracto genital masculino, y con ello una posterior liberación de mediadores químicos de la inflamación. Estos mediadores de la inflamación, tales como la interleucina IL-6 e IL-8, pueden reclutar y activar los leucocitos (Comhaire, *et al.*, 1999). La activación de los leucocitos pueden generar altos niveles de ROS en el semen, que puede abrumar a las estrategias de antioxidantes y puede progresar en estrés oxidativo. Otro factor causal sería el hecho de que el plasma seminal en los fumadores contiene niveles más bajos de antioxidantes que la de los no fumadores (Fraga, *et al.*, 1996).

#### 1.4.6 Interferencia iatrogénica

Una amplia variedad de protocolos de preparación de espermatozoides están actualmente disponibles para su uso en reproducción asistida. Sin embargo, estas estrategias implican el uso de repetidas centrifugaciones a alta velocidad y el aislamiento de los espermatozoides del entorno antioxidante de protección proporcionada por el plasma seminal. Se han demostrado que la alteración del ADN espermático surge a través de mecanismos que están mediados por la mayor generación de ROS (Zalata, *et al.*, 1995).

Normalmente, el plasma seminal contiene factores de alto y bajo peso molecular que protegen a los espermatozoides contra la toxicidad de ROS. Ellos incluyen eliminadores de ROS enzimáticos, tales como Cu, Zn, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Siciliano, *et al.*, 2001). Además, el plasma seminal también contiene proteínas como ascorbato, urato, albúmina, glutatión y taurina que tienen función de antioxidantes (Thiele, *et al.*, 1995). Por lo tanto, el plasma seminal juega un papel protector importante contra las ROS, y su eliminación durante la preparación del espermatozoide puede ser peligrosa para la integridad del ADN de los espermatozoides (Potts, *et al.*, 1999b)

Otra forma de interferencia iatrogénica que conduce al daño en el ADN es la criopreservación, que actualmente es ampliamente utilizada en reproducción asistida. La mayoría de los estudios indican que el proceso de congelación-descongelación daña significativamente el ADN de los espermatozoides (Donnelly, *et al.*, 2001; Labbe, *et al.*, 2001). El daño al ADN de los espermatozoides en estas situaciones se puede atribuir al hecho de que los espermatozoides de los hombres infértiles tienen una mayor incidencia de una organización irregular de la cromatina y por lo tanto muestran una disminución significativa en la resistencia de la cromatina a la desnaturalización térmica. Otro posible factor es la falta de componentes de protección en el plasma seminal (Donnelly, *et al.*, 2001).

#### 1.4.7 Daños en el ADN espermático en pacientes con cáncer

El cáncer testicular, la enfermedad de Hodgkin y la leucemia son algunas de las enfermedades más comunes que afectan a los hombres en edad reproductiva (Agarwal, *et al.*, 1996). Las terapias multimodales contra el cáncer han mejorado significativamente; por lo tanto, las tasas de supervivencia para los pacientes jóvenes que sufren de éstas enfermedades (Sociedad Americana del cáncer, 2004). Sin embargo, las terapias del cáncer son a menudo agresivas y los efectos secundarios no deseados son comunes. Además la quimioterapia y la radioterapia afectan significativamente la espermatogénesis. Por tal motivo, la presencia de cualquier tipo de cáncer afecta el conteo de espermatozoides y la motilidad en pre-congelación y posterior descongelación (Agarwal y Newton, 1991). Existen reportes que indican que la infertilidad está asociada con el cáncer testicular, inclusive antes de administrar algún tipo de terapia. Los pacientes con cáncer que no reciben ningún tratamiento tienen el ADN dañado significativamente mayor que los hombres fértiles sanos (Kobayashi, *et al.*, 2001).

#### 1.4.8 Las drogas y radiación

Los medicamentos quimioterapéuticos, tales como fludarabina, ciclofosfamida y busulfán pueden causar daño testicular, y se manifiesta por la disminución de volumen testicular, oligozoospermia, sobreproducción de FSH y LH así como las concentraciones bajas de testosterona (Chatterjee, *et al.*, 2000). Los altos niveles de daño en el ADN espermático se puede ver reflejados después de una sola dosis de estos medicamentos, que pueden persistir durante varios meses después aunque ya hayan dejado de usarse (Cai, *et al.*, 1997).

El consumo de cocaína también afecta el ADN del espermatozoide; en estudios anteriores se determinó que la exposición a la cocaína conduce a un aumento en rompimientos de la cadena del ADN y éste interesante hallazgo se ha relacionado a un aumento de la apoptosis (Li, *et al.*, 1999).

Las células germinales masculinas son sensibles a los efectos mutagénicos de la radiación. Aunque el daño del ADN espermático existe después de la radioterapia, no se detectó un aumento en defectos genéticos o malformaciones congénitas en los niños concebidos por padres que habían sido sometidos previamente a tratamiento (Arnón, *et al.*, 2001).

Por último, un tipo de terapia alternativa a base de hierbas de medicinales se ha vuelto tan popular a pesar de la falta de evidencia científica para evaluar su eficacia y seguridad. En un estudio realizado para evaluar el efecto de algunas de estas hierbas ampliamente utilizados sobre el ADN del espermatozoide, se encontraron altas concentraciones de la hierba de San Juan, *el Gingko biloba* y *Echinacae púrpura* pueden dañar a las células reproductoras y fueron aún más mutagénicos para las células espermáticas (Ondrizek, *et al.*, 1999).

El papel de las enfermedades de transmisión sexual es otro de los factores que pueden intervenir en la integridad del ADN, tales como *Ureaplasma urealyticum*. Sin embargo, la exposición a condiciones ambientales adversas y el ritmo de vida que actualmente llevan las personas también influyen en el aumento de la incidencia del daño en el ADN espermático (Reichart, *et al.*, 2000).

## 1.5 TÉCNICAS PARA EMPLEADAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN EN ESPERMATOZOIDES

En la actualidad, la evaluación de la calidad de un espermatozoide esta basado sólo en sus características morfológicas, las cuales no son suficientes para determinar la presencia de rupturas en el ADN. Por tal motivo; se han desarrollado varias técnicas, objetivas y reproducibles, para detectar rupturas de hebra simple o doble en el ADN espermático. Estas incluyen métodos directos, tales como, los ensayos de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferasemediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick end-labeling*) y Prueba "Cometa" o electroforesis de célula única en gel (*single-cell gel electrophoresis assay*) e indirectos como el

análisis de la estructura de la cromatina (SCSA). Este último evalúa la susceptibilidad de los espermatozoides a la desnaturalización ácida, característica que es proporcional a la cantidad de rupturas de las hebras de ADN. En general, estas técnicas no son utilizadas debido a su complejidad, alto costo por los reactivos y los equipos que se utilizan (citometría de flujo y/o microscopía de fluorescencia). Hasta ahora, los estudios realizados utilizando estas metodologías han demostrado una clara asociación entre la fragmentación del ADN de los espermatozoides y las tasas bajas de fecundación, desarrollo embrionario y embarazo; por lo tanto, apoyan su utilidad en medicina reproductiva (Borini, *et al.*, 2006).

### 1.5.1 Ensayo TUNEL

El ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase- mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End Labeling) es una metodología que se basa en el principio de que la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) incorpora desoxiuridil-Trifosfato (dUTP) en regiones con rupturas en las cadenas dobles o simples del ADN. Básicamente, en el ensayo se incorpora desoxiuridina biotinilada al 3'OH del ADN, la cual actúa como señal y puede ser detectada fácilmente, por ejemplo, a través de técnicas fluorescentes. Cuantas más roturas tenga el ADN mayor será la señal resultante. En los espermatozoides con ADN normal sólo se detecta fluorescencia de fondo, mientras que en los espermatozoides con ADN fragmentado (múltiples 3'-OH terminales) emiten una fluorescencia intensa (Gorczyza, *et al.*, 1993; ver figura 3). Ésta metodología puede emplear citometría de flujo o microscopía de fluorescencia ( Agarwal y Tamer, 2003).

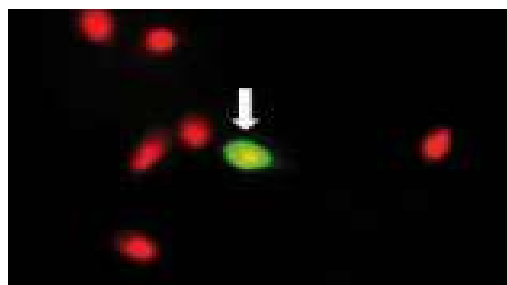


Fig. 3. Ensayo TUNEL a través de Microscopía de Fluorescencia (1000X). La flecha indica presencia de fragmentación (Enciso, 2009).

### 1.5.2 Ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA)

El ensayo se basa en el principio de que la cromatina anormal presenta una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente (ver figura 4). El grado de desnaturalización resultante, como consecuencia de su tratamiento mediante calor o en un ambiente ácido, se determina midiendo el cambio metacromático del colorante anaranja de acridina (AO) de fluorescencia verde (AO intercalado en ADN de doble hebra) a una fluorescencia roja (AO intercalado en una sola hebra). El mas importante parámetro de éste ensayo es el índice de fragmentación de ADN (DFI), el cual representa la población de células con el ADN dañado (Evenson, *et al.*, 2002).

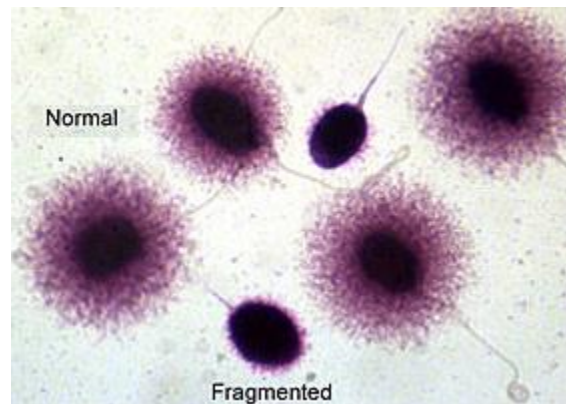


Fig. 4. Ensayo SCSA donde la formación del halo representa ADN normal (Enciso, 2009).

### 1.5.3 Análisis de *in situ* nick translation (ISNT)

Éste ensayo cuantifica la incorporación dUTP (desoxiuridin trifosfato) biotinilado a las roturas del ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por la polimerasa I. El ensayo ISNT detecta los espermatozoides que contienen valores apreciables de daño endógeno en su ADN. Los resultados del análisis de ISNT indican la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide durante su maduración (Agarwal y Allamaneni, 2005).

#### 1.5.4 Prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD)

La prueba se ha descrito recientemente como una técnica simple y de bajo costo para el análisis de la fragmentación de ADN del espermatozoide. La prueba de SCD se basa en el principio de que los espermatozoides con ADN fragmentado no pueden producir un halo característico (ver figura 5), cuando estos se mezclan con agarosa de bajo punto de fusión después de pasar por un proceso de desnaturalización ácida que permite la eliminación de las proteínas nucleares (Fernandez, *et al.*, 2003).

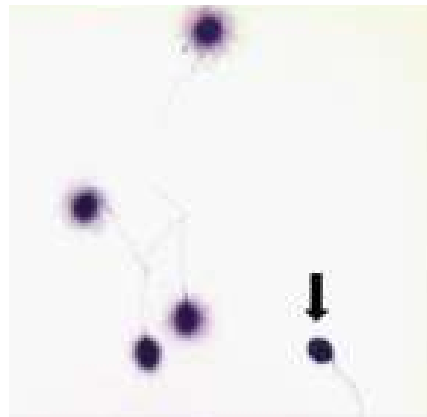


Fig. 5. Ensayo SCD. Microscopía de campo claro (400x). La flecha indica espermatozoide con ADN fragmentado. Imagen tomada de Horta y colaboradores (2011).

#### 1.5.6 Prueba cometa

El *ensayo de cometa* o electroforesis de células individuales en gel es un método sensible, rápido y relativamente de bajo costo para cuantificar daño en el ADN de células individuales. Puede ser realizado bajo condiciones neutras, detectando rupturas de doble cadena del ADN, o bajo condiciones alcalinas, detectando rupturas de simple cadena. En esta técnica las células son embebidas en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, y posteriormente sometidas a lisis mediante un agente reductor de grupos sulfhidrilo de las protaminas y luego son corridas por electroforesis durante un corto tiempo. Después el microgel es teñido con

fluorocromos de afinidad al ADN y después observadas por microscopia de fluorescencia. Las células con mayor daño del ADN muestran una migración aumentada desde la parte central del núcleo hacia el ánodo, generando una imagen similar a la cola de un cometa (ver figura 6). Los espermatozoides que no presentan fragmentación no generan esta imagen. La importancia de este ensayo radica en la posibilidad de poder detectar fragmentación de simple o doble cadena del ADN espermático ya que cada una de ellas tiene diferente impacto luego de la fecundación (Agarwal y Allamaneni, 2005)

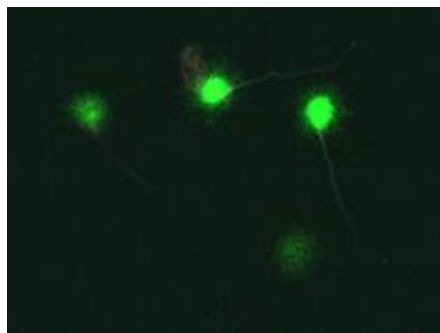


Fig.6. La formación de cometas indica presencia de ADN fragmentado (Horta, 2011)

#### 1.5.7 Prueba de fragmentación de ADN con tinción de Anaranjado de Acridina

Otro de los ensayos empleados es la tinción de anaranjado de acridina, cuya afinidad hacia los ácidos nucleicos permite medir la susceptibilidad del ADN del espermatozoide al ácido inducido por la desnaturalización *in situ*. La determinación de la fragmentación es por la cuantificación del cambio metacromático del anaranja de acridina fluorescente del verde (ADN intacto) al rojo (ADN desnaturalizado; ver figura 7). El anaranja de acridina se intercala entre las dobles cadenas de ADN como un monómetro y liga las cadenas simples del ADN como un agregado. El anaranja de acridina tiñe al ADN intacto de color verde fluorescente mientras que el anaranja de acridina agregado al ADN desnaturalizado emite una fluorescencia de color rojo (Larson, *et al.*, 2000).

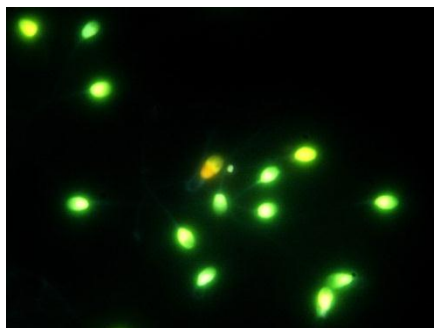


Fig. 7. Tinción anaranjado de acridina: espermatozoides verdes-ADN integro, espermatozoides de color anaranjado, rojo, amarillo: ADN fragmentado (Enciso, 2009).

## 1.6 TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La presencia de anomalías en el ADN del espermatozoide ha sido muy destacada debido a diversas publicaciones en las que se correlaciona el grado de daño con varios índices de fertilidad, como la tasa de fertilización, la tasa de división embrionaria, la tasa de implantación, el índice de embarazos y el índice de productos nacidos vivos (Agarwal y Allamaneni, 2005). Sin embargo, cuando las probabilidades de embarazo son bajas, independientemente de las causas, se ha recurrido al empleo de técnicas de reproducción asistida, las cuales omiten muchas de los procesos de selección natural pero que favorecen la obtención de un embarazo.

### 1.6.1 Inseminación artificial (IA)

La inseminación artificial se define como el proceso de depósito de espermatozoides de forma no natural dentro del tracto reproductor femenino (ver figura 8), la zona exacta donde se realizó la deposición de los espermatozoides depende de la técnica concreta de inseminación que se realice por ejemplo: Intracervical, intrauterina, etc. Esta técnica es sencilla y de muy bajo costo, consiste en introducir una cánula cargada de espermatozoides dentro de tracto reproductor femenino con el objetivo de acercar el espermatozoide al óvulo y tener mayores tasas de éxito de fertilización. La inseminación artificial intrauterina (IUI)

es una de las técnicas más utilizadas actualmente; sin embargo, el grado de fragmentación de ADN resulta como predictor del éxito de IUI utilizando ensayo TUNEL. Otro estudio encontró que el grado de fragmentación de ADN espermático fue significativamente menor en la muestras que dieron como resultado embarazo ( $7.3 \pm 3.5$  versus  $13.9 \pm 10.8$ ,  $P < 0.044$ ) ( Agarwal y Tamer, 2002) . Además, ninguna mujer inseminada con una muestra que tiene  $>12\%$  de espermatozoides con ADN fragmentado pudo lograr un embarazo. Por otra parte, las pacientes que fueron inseminadas con muestras que contienen altos grados de daño en el ADN ( $10 \pm 12\%$ ) experimentaron abortos espontáneos (Duran, *et al.*, 2002).

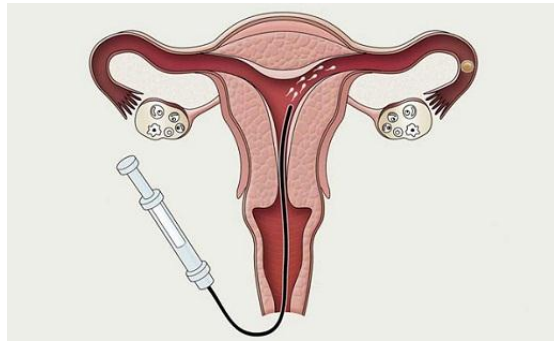


Fig.8 Introducción de espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino, Imagen tomada por clínica Reproducción Asistida.

### 1.6.2 Fertilización *in vitro* (FIV)

La fertilización *in vitro* es una técnica que permite poner en contacto al óvulo y los espermatozoides, dentro de una caja Petri, con la finalidad de facilitar el proceso de fertilización (ver figura 9). Desafortunadamente, numerosos estudios muestran que los daños en el ADN espermático no afectan el proceso de fertilización pero favorecen las probabilidades de la interrupción del embarazo tras la realización de una FIV. Se ha observado, mediante el método de TUNEL que el 40% de los espermatozoides obtenidos de muestras seminales, procedentes de la consulta de

esterilidad, presentan fragmentación en su ADN. Asimismo, en las FIV se observaron una correlación inversa entre el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN y el índice de fertilización e implantación (Sun, *et al.*, 1999).



Fig. 9. Espermatozoides rodeando al óvulo, con el objetivo de iniciar el proceso de fertilización.  
Imagen tomada de Fertygen.

### 1.6.3 Inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)

La ICSI es una herramienta que permite colocar, a través de una aguja de borosilicato un sólo espermatozoide dentro del ovocito (ver figura 10). Esta metodología ha tenido un éxito importante en pacientes que presentan oligospermia o aztenospermia. Sin embargo, esta técnica omite muchos de los procesos de selección más importantes que suceden en la fertilización normal: reacción acrosomal, fusión de membrana, reacción cortical, etc. Igualmente a la FIV, el daño del ADN espermático, valorado mediante TUNEL, se correlaciona inversamente proporcional con la tasa de fertilización en la ICSI. En pacientes con un alto daño del ADN espermático (>25%), la fertilización fue >20%. La proporción de espermatozoides con fragmentación del ADN cerca del 10% influye directamente en la tasa de fecundación e implantación de los embriones obtenidos mediante ICSI. Sin embargo, las probabilidades de embarazo son nulas cuando existe un 20% de espermatozoides con resultados positivos para TUNEL, por lo que se sugiere que el daño del ADN puede tener un buen valor importante en los

casos de fallo en la implantación de embriones de buena calidad (Benchaib, *et al.*, 2003).



Fig.10 Inyección intracitoplasmática del espermatozoide, Imagen tomada por Infert.

## 1.7 CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación de células, embriones y tejidos se ha establecido como un concepto válido en la medicina reproductiva. La búsqueda de crioprotectores adecuados así como las concentraciones apropiadas y las variaciones en la rehidratación de las muestras después de la descongelación, han sido de las principales prioridades para poder estandarizar los métodos de congelación (Nawroth, *et al.*, 2005). La criopreservación tiene como objetivo mantener la viabilidad y la funcionalidad de las células a bajas temperaturas (Woods, *et al.*, 2004).

Hace muchos años, los espermatozoides de diferentes especies de mamíferos fueron criopreservados exitosamente (Isachenko, *et al.*, 2004). Pero, en específico, los espermatozoides humanos fueron los primeros en ser criopreservado y fueron descritos hace más de 50 años (Oehninger, 2000). La criopreservación es fundamental para los pacientes sometidos a tratamientos médicos o quirúrgicos que pueden inducir esterilidad, como pacientes con cáncer que van a someterse a quimioterapia o radioterapia. El cáncer testicular y de Hodgkin son las

enfermedades más comunes, que afectan principalmente a varones en edad reproductiva, por lo que los pacientes recurren a la preservación de sus espermatozoides (Saito, *et al.*, 2005). Los avances en los tratamientos de cáncer y las tecnologías de reproducción asistida son cada vez más sofisticadas, por lo que han abierto nuevas posibilidades para los hombres infértiles o cuya fertilidad se ve amnezada (Paoli, *et al.*, 2014).

Dentro de los métodos de criopreservación se encuentra la vitrificación o congelación en vapores de nitrógeno líquido (96°C). Fahy y colaboradores (1984) definieron a la vitrificación como un proceso de solidificación de una solución a baja temperatura sin que ésta llegue a formar cristales debido a un enorme incremento de la viscosidad manteniendo así la distribución molecular e iónica que existía antes de la congelación. Otro método de congelación es la ultravitrificación o congelación ultrarápida (-196°C) se basa en la rápida deshidratación celular con ayuda de un crioprotector (Boiso, 2001). De tal manera que las células o los tejidos se colocan en el crioprotector y luego se sumerge directamente en nitrógeno líquido. El agua se sustituye en gran medida por el crioprotector. La velocidad de enfriamiento es alcanzado entre 15,000 a 30,000°C/min, y el agua se transforma directamente de la fase líquida a un estado vítreo vitrificado. Con este método no se forman cristales de hielo que pueden dañar las células o los tejidos. (Nawroth, *et al.*, 2005).

Los crioprotectores son sustancias químicas que protegen a las células del daño producido por la formación de cristales de hielo (Ávila, *et al.*, 2006). Aunque la composición química de estos crioprotectores difiere, todos ellos son muy solubles en agua y tienen una toxicidad dependiente de la concentración. Ellos trabajan directamente en la membrana celular a través de interacciones electrostáticas, bajan el punto de congelación de la solución y la modificación de los entornos tanto intra como extracelulares porque desplazan el agua, evitando la formación de cristales de hielo. Hay dos clases principales de crioprotectores: Crioprotectores permeables: penetran en la membrana celular. Esta clase incluye dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, 1,2 propanodiol (PROH) y etilenglicol. Estas

sustancias hidrófilas tienen un peso molecular de menos de 400 y atraviesan la membrana muy fácilmente, creando un gradiente osmótico y haciendo que el agua salga de la célula mediante la reducción aún más el punto de congelación (Paoli, *et al.*, 2014).

Y crioprotectores no permeables, los cuales no atraviesan la membrana celular. Estos incluyen sacarosa, fructosa, glucosa, dextrosa, almidón, lipoproteínas y polivinilpirrolidona (PVP). Estas moléculas son grandes, con un peso molecular mayor que 1.000 daltons, y aumentan la concentración de solutos extracelulares, generando de ese modo un gradiente osmótico que hace que el agua salga de la célula, lo que lleva a la deshidratación antes de la congelación (Paoli, *et al.*, 2014).

Durante los últimos años, se han introducido complejos crioprotectores para intentar mejorar la recuperación funcional de los espermatozoides después de la congelación. El glicerol fue el primer crioprotector más usado comúnmente para los espermatozoides, sin embargo, se ha demostrado que tiene efectos tóxicos sobre los espermatozoides (Stanic, *et al.*, 2002). Otros crioprotectores incluyen moléculas inertes, citrato, yema de huevo o leche, fructosa, TEST {TES [N-Tris (hidroximetil) metilaminoetanolina ácido sulfónico], Tris [(hidroximetil) aminometano]}- citrato-buffer de yema, la yema- citrato – dextrosa – glicina, yema de huevo y citrato. Por otra parte, el medio de preservación de espermatozoides humanos (HSPM) contiene glicerol, glicina, y sacarosa como agentes crioprotectores (Stanic, *et al.*, 2002). La yema de huevo, se compone de lipoproteínas, fosfolípidos, colesterol, y otros diversos elementos menos abundantes, también se utiliza en combinación con Tris buffer para constituir TEST yolk buffer (TYB) para la criopreservación de espermatozoides con una buena tasa de recuperación después de descongelados (Kukis, 1992). La yema de huevo puede jugar un papel en la reducción de los efectos perjudiciales sobre la estructura de la membrana en soluciones salinas hiperosmóticas que se producen durante el enfriamiento rápido. Por lo tanto, el uso de un agente crioprotector es indispensable en la prevención de lesiones en los espermatozoides humanos durante el proceso de criopreservación (Hammadeh, *et al.*, 2001).

Sin embargo, la congelación y descongelación del semen humano implica una cierta pérdida de la motilidad del espermatozoide y la capacidad de fertilizar (Gao & Crister, 2000). El choque térmico, la formación de cristales de hielo, la deshidratación, el aumento de la concentración de sal después la congelación y el choque osmótico son factores que dañan al espermatozoide cuando se somete a congelación. También se debe considerar dos aspectos principales que influyen directamente en el resultado de la congelación y descongelación como es la calidad del semen y el procedimiento utilizado para la congelación y descongelación. Por lo que la supervivencia de las células depende principalmente del método de criopreservación y el crioprotector que se use (Hammadeh, *et al.*, 2001).

## 2. ANTECEDENTES

El factor de infertilidad masculina juega un papel importante y está relacionado con aproximadamente el 50% de las parejas infértiles (Organización Mundial de la Salud, 2010). En el 2010, se estimó que 48,5 millones de parejas en todo el mundo son infértiles (Mascarenhas, *et al.*, 2012).

El primer manuscrito en la detección *in situ* de la fragmentación del ADN espermático con la instrumentación automatizada se publicó hace 25 años, pero en los últimos 5 se han publicado diversos estudios sobre la fragmentación del ADN espermático (Spano, *et al.*, 2000). Estos datos proporcionan una gran evidencia de que las muestras de semen que contienen un umbral estadístico de  $\geq 30\%$  de fragmentación del ADN espermático tienen un nivel reducido de éxito del embarazo (Evenson & Wixon., 2006). Otro estudio realizado por Spano y colaboradores (2000) mostró que cuando el daño en el ADN es  $\geq 20\%$  se observa una disminución en la fertilidad masculina. Pero cuando el grado de lesión sobrepasa el 40%, la probabilidad de conseguir un embarazo es nula. Por tal motivo, muchas parejas que no han podido concebir de manera natural han tenido que recurrir a técnicas de reproducción asistida. También existen otras razones por las que los pacientes recurren a este tipo de técnicas, y es por que su fertilidad se ve amenazada por tratamientos como la radioterapia, la quimioterapia o la cirugía invasiva, que incluso pueden conducir a insuficiencia testicular o disfunción eyaculatoria; por tales motivos acuden a la criopreservación de sus células germinales con la finalidad de poder procrear hijos en un futuro. Por otra parte, en situaciones de alteración de la fertilidad masculina, el almacenamiento de espermatozoides proporcionará el tiempo necesario para una cantidad razonable de los espermatozoides que se obtengan para la inseminación artificial exitosa o la fertilización *in vitro* (Isachenko, *et al.*, 2004)

Sin embargo la motilidad, la integridad del ADN y la tasa de fecundación se ven afectados negativamente por la criopreservación. La criolesión causa daño a una gran variedad de orgánulos celulares y sucede debido a las tensiones de la

criopresevación (es decir, la formación letal de cristales de hielo intracelulares y la disolución, deshidratación celular, daño osmótico durante la adición o eliminación de agentes crioprotectores, y el efecto de la elevada concentración de solutos dentro de la célula o cambios en la permeabilidad de la membrana durante el proceso de enfriamiento y calentamiento) (Gao y Critser, 2000; Gilmore, *et al.*, 2000). Incluso las etapas de enfriamiento por debajo del punto de congelación del medio pueden imponer estrés en las células. Por lo tanto, la criopreservación exitosa de células se ve afectada por la velocidad de congelación, el medio en el que las células se congelan y el crioprotector (Holt, 2000).

Prins y Weidel (1986) compararon ocho crioprotectores, con espermatozoides humanos congelados en TES-citrate-yolk buffer con 6% de glicerol dando como resultado la mejor recuperación de células móviles después de la descongelación. En otro estudio comparativo de 12 medios crioprotectores, la mejor motilidad después de la descongelación se logró con medio de yema de huevo-citrato-dextrosa-glicina en 7,5% de glicerol (Brotherton, 1990). Estas evidencias muestran que actualmente el crioprotector a base de yema de huevo es más eficiente con respecto a otros agentes crioprotectores. Sin embargo, no se ha evaluado su efecto utilizando una técnica de vitrificación de espermatozoides y ni las alteraciones que pueden adquirir en su ADN.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La transferencia de la molécula de ADN de manera íntegra e intacta del espermatozoide al ovocito es crucial para conseguir una fecundación con éxito (Aravindan, *et al.*, 1997).

Para el estudio de la infertilidad masculina la Organización Mundial de la Salud ha establecido una serie de parámetros básicos que se deben analizar de manera rutinaria como: Volumen del eyaculado, concentración de espermatozoides, motilidad, morfología y pH. Sin embargo, se estima que aproximadamente un 15% de los varones estériles presentan un espermiograma normal. Es decir, existe una población de hombres con problemas reproductivos que muestran características de concentración, motilidad y morfología normales. Por ésta razón, se puede deducir que muchas de las veces los parámetros seminales no son del todo indicativos de la calidad del espermatozoide. Cabe señalar, que la situación es mucho más crítica cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida, ya que la calidad del espermatozoide que se utiliza requiere de un control mucho más estricto (Guzick, *et al.*, 1998).

Existe un cierto número de etiologías que han sido identificadas como posibles causas de infertilidad masculina; sin embargo cerca del 50% de éstas causas son consideradas como idiopáticas (Ollero, *et al.*, 2001). En las últimas décadas se ha propuesto otra posible causa de infertilidad masculina: la fragmentación del DNA espermático. Como ha sido demostrado, la integridad del DNA es de vital importancia para la fecundación, la implantación y el desarrollo del embrión. En la actualidad, existen diversas técnicas que nos permiten analizar este nuevo parámetro aunque algunas son de costo alto y que requieren de equipos sofisticados y que a veces son un tanto subjetivas, pero sobre todo, son de vital importancia cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida.

En los últimos años, el número de pacientes jóvenes que presentan algún tipo de cáncer se ha incrementado drásticamente y por tal motivo tienen que ser sometidas a tratamientos invasivos como la quimioterapia y la radioterapia. Para

este tipo de dificultades, se han ideado métodos de criopreservación de gametos con la finalidad de que en un futuro puedan procrear y dejar descendencia; sin embargo, aún se desconocen las alteraciones que puede adquirir el espermatozoide durante la criopreservación. Por este motivo, se propone evaluar el efecto de la criopreservación sobre las características morfológicas y fisiológicas del espermatozoide y sobre todo en la integridad del ADN espermático para evitar abortos espontáneos, anomalías embrionarias, etc.

## **4. OJETIVOS**

### *4.1 Objetivo general*

Evaluar características morfológicas y fisiológicas de espermatozoides humanos así como la integridad del ADN espermático, en muestras criopreservados por vitrificación y ultravitrificación

### *4.2 Objetivos específicos*

- Evaluar la viabilidad celular de muestras frescas y criopreservadas por vitrificación y ultravitrificación.
- Evaluar el efecto de los procedimientos de vitrificación sobre la actividad metabólica de los espermatozoides de las muestras frescas y criopreservadas.
- Analizar las características morfológicas de muestras frescas y criopreservadas por medio de vitrificación y ultravitrificación.
- Evaluar la integridad de la cromatina espermática mediante anaranjado de acridina y prueba cometa.
- Evaluar el efecto de los crioprotectores sobre las características celulares de los espermatozoides.

## 5. HIPÓTESIS

- La viabilidad de los espermatozoides se afectará drásticamente por el uso de los métodos de congelación.
- La actividad de metabólica aumentará en los espermatozoides congelados por la generación de especies reactivas.
- La criopreservación de los espermatozoides provocará cambios en su morfología.
- La congelación de los espermatozoides inducirán la fragmentación de su cromatina.
- El semen funcionará como mejor crioprotector ya que protege a los espermatozoides cuando se encuentra en ambientes extremos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención de la muestra

Para este estudio se recolectaron 15 muestras de eyaculados frescos obtenidos de donadores voluntarios sanos en rango de edad entre los 18 a 35 años. Las muestras se obtuvieron mediante masturbación y se recolectaron en recipientes de plástico estériles. Los donadores voluntarios fueron instruidos para tener abstinencia sexual por un período de mínimo 2 días y máximo 5 días. Las muestras colectadas fueron incubadas a 36°C por 60 minutos hasta alcanzar la licuefacción, posteriormente se procedió a analizar las muestras mediante una espermotobioscopia.

### 6.2 Espermotobioscopia

A las muestras frescas así como las criopreservadas por un mes se les evaluó los parámetros seminales (volumen, viabilidad, motilidad, morfología y concentración de espermatozoides) de acuerdo al manual propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010).

Tabla 1. Valores de referencia, propuesto en 1999 y 2010 del límite de referencia inferior (LRI) en un espermograma, (OMS, 2010).

	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

### 6.3 Concentración celular de la muestra

Para determinar la concentración de células de la muestra, se realizó un dilución de acuerdo a la cantidad de células existentes en el semen con la solución inmovilizadora para espermatozoides ( $\text{NaHCO}_3$  2.9% y formaldehído 1%). De ésta muestra se tomó 10  $\mu\text{l}$  y se colocó en la cámara (ver figura 11). La concentración de espermatozoides se expresó en millones/mL. Para la obtención de esto se utilizó el promedio del conteo de dos cámaras del hemocitometro y se multiplico por el factor del dilución y de volumen de la cámara.

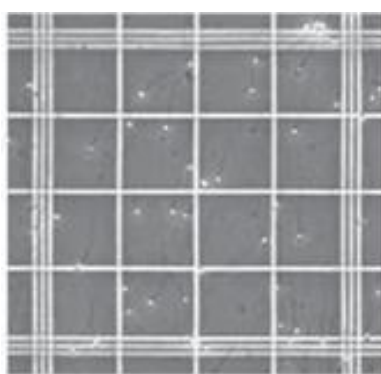


Fig. 11. Cuadrante de la cámara de Neubauer, para realizar el conteo del espermatozoides (OMS, 2010)

### 6.4 Movilidad

Para establecer la movilidad de los espermatozoides, se analizarón tres categorías: movimiento progresivo (*tipo A*), *in situ* (*tipo B*) e inmóviles (*tipo C*). Para ello se tomó 10  $\mu\text{l}$  de semen y se colocaron en un portaobjetos y fueron cubiertos con un cubreobjetos. Posteriormente se contarón 200 células mediante microscopia en contraste de fases utilizando el objetivo de 40X. Finalmente, se sacaron los porcentajes ( $200=100\%$ ) de cada uno de las categorías, y la movilidad total ( Mov. Progresivo e *in situ*).

### *6.5 Tratamiento de las muestras*

Los espermatozoides de cada muestra se lavaron dos veces, se centrifugaron a 500 rpm durante 15 minutos y se resuspendieron a temperatura ambiente en medio TALP (114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10.0 mM Lactato de Sodio, 0.5 mM Piruvato de Sodio, 2.0 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, adicionada de 100 mg/L Penicilina y 100 mg/L Estreptomina (48)), con el objetivo de eliminar el liquido seminal. Las células fueron resuspendidas en la solución TALP a una concentración de 100x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml.

### *6.6 Determinación de la viabilidad de los espermatozoides*

El porcentaje de viabilidad de las células se analizó mediante el kit LIVE/DEAD sperm viability® Kit (Molecular Probes). Se tomó un alícuota de semen (10 µl) y se le adicionó 1 µl de ioduro de propidio (1:10) y 1 µl de SYBR14 (1:100 diluido con DMSO), se mezcló cuidadosamente por inversión. Se dejó en reposo por cinco minutos y posteriormente se observó por microscopia de fluorescencia con el objetivo de 40x. Se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos, ya que mostrarán una coloración verde. Por el contrario, los espermatozoides muertos que se tornarán de color rojo, se hizo un conteo de 200 células en total. El fundamento de estos fluorocromos se basó en la permeabilidad de la membrana, cuando el SYBR14 permea por la membrana emitirá un color verde, la cual dictaminó que la membrana de la célula esta íntegra. Por otro lado, si el ioduro de propidio atraviesa por la membrana, la célula fluorescerá de color rojo y fue señal de que la membrana del espermatozoide esta dañada.

### *6.7 Actividad metabólica*

Para la valoración de la actividad metabólica de los espermatozoides por individuo se utilizó resazurin, un compuesto diseñado para medir proliferación celular y citotoxicidad de algunos agentes. Este compuesto incorpora un indicador de óxido reducción (REDOX), que emitió una fluorescencia y cambia de color en respuesta a la reducción química del medio como resultado de la actividad metabólica de las

células. A dos millones de espermatozoides se les adicionó 10 µl del indicador REDOX Resazurin (Molecular Probes), se incubaron por 30 minutos a 37° y posteriormente las muestras se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia (Nikon E-600).

### *6.8 Análisis de la morfología de los espermatozoides*

Para determinar la morfología de las células, se colocó 10 µl de semen en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos, se contaron 200 células bajo en el microscopia de campo claro. Se hizo una clasificación de acuerdo a la morfología: Espermatozoides normales, espermatozoides con deficiencias en la cabeza (macrocéfalicos, microcéfalicos, etc), espermatozoides con deficiencias en la parte media y espermatozoides con anormalidades en la cola (ver figura 13). Los resultados de la evaluación morfológica se expresaron como el porcentaje de las diferentes categorías de espermatozoides (200 células = 100%).

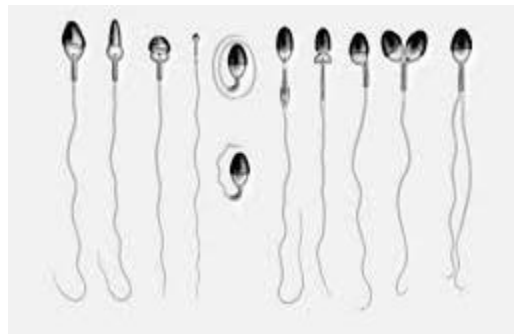


Fig. 12. Anormalidades que presentan los espermatozoides humanos (OMS, 2010)

### *6.9 Criopreservación de las muestras*

Las técnicas de criopreservación por las cuales fueron preservadas las muestras fueron vitrificación y ultravitrificación. El crioprotector que se usó para criopreservar las muestras fue a base de yema de huevo (yema de huevo 12%, glucosa 5.5%, etilenglicol 3,5%, estreptomycin 4mg/ml) el cual se esterilizó por

filtración utilizando una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45µm. La concentración a la cual fueron almacenadas las células fue a  $50 \times 10^6$ .

Las alícuotas fueron incluidas en los medios crioprotectores en un dilución 1:1 de acuerdo a los siguientes grupos experimentales: Líquido seminal, líquido seminal/crioprotector y crioprotector.

El método de conservación fue a través de la formación de perlas, las cuales fueron formadas según la técnica de criopreservación. Para la vitrificación, una gota de la muestra (70 µl) fue depositada sobre un portaobjeto previamente congelado en vapores de nitrógeno líquido dentro de un contenedor térmico. Las perlas fueron transferidas a un criotubo y se almaceno inmediatamente en un tanque de NL<sub>2</sub>. Para la ultravitrificación un gota de la muestra fue depositada directamente en nitrógeno líquido. Las perlas fueron recuperadas y colocadas en un criotubo previamente atemperado en NL<sub>2</sub>. Los tubos fueron almacenados en NL<sub>2</sub> por un mes. Posteriormente se descogelaron de manera rápida y se analizaron todos los parámetros seminales nuevamente así como las pruebas de fragmentación.

Tabla 2. Diseño del experimento, espermatozoides frescos y congelados en diferentes medios crioprotectores.

<b>Método</b>	<b>Medio Crioprotector</b>	<b>Parámetros a analizar</b>
Vitrificación	Líq. seminal	*Espermatobioscopia
	Líq. seminal/crioprotector	*Actividad metabólica
	Crioprotector	*Pruebas de fragmentación
Ultravitrificación	Líq. seminal	-Tinción AO
	Líq. seminal/crioprotector	-Prueba cometa
	Crioprotector	

#### *6.10 Determinación de la fragmentación de los espermatozoides por microscopia de fluorescencia.*

La tinción con anaranjado de acridina es un método citoquímico utilizado para la determinación de integridad del ADN y se utilizó para el espermatozoide. Para evaluar la fragmentación del ADN de los espermatozoides, recién obtenidos y después de los periodos de criopreservación, 100 µl de cada muestra individual se incubó con 0.01 mg/ml de la solución de anaranjado de acridina (AO) por 10 min. Se prepararon los frotis y observaron bajo un microscopio de epifluorescencia y confocal (Nikon C1). La unión monomérica del anaranjado de acridina al ADN de doble hebra emite una fluorescencia de color verde, mientras que el agregado de anaranjado de acridina a ADN de una sola hebra emite fluorescencia de color amarillo a rojo (ADN fragmentado).

#### *6.11 Evaluación de la fragmentación de los espermatozoides por prueba COMETA.*

La prueba COMETA es una metodología muy sensible que permite cuantificar el número de células fragmentadas. La prueba está basada en el principio de que fragmentos pequeños de ADN migran distancias largas hacia el ánodo sobre un campo electroforético adoptando una imagen de cometa, mientras que los fragmentos grandes, como los núcleos sin fragmentación, sólo muestran una estructura compacta sin desplazamiento de ADN. Brevemente, sobre un portaobjetos se formó una base de una solución de agarosa al 1.5%. Posteriormente, se agregó una segunda capa de agarosa formada por una mezcla de espermatozoides y agarosa de bajo punto de fusión al 1% seguida de una tercera capa de agarosa al 1%. Posteriormente, las preparaciones se incubaron en buffer de lisis alcalino (NaCl 2.5M, EDTA 0.1M, Tris 10mM, TritonX-100 1%, DMSO 1%, Ditiotretol 10mM a un pH de 10) por un lapso de 30 minutos a 4°C y protegidos de la luz. Después, los portaobjetos fueron lavados con amortiguador Tris [0.4 M], y colocados en una cámara de electroforesis horizontal donde se hizo un corrimiento electroforético a 300 miliamperios por 30 minutos. Inmediatamente,

cada una de las laminillas fue lavada en medio de neutralización (Tris 0.4 M, pH 7.5). Después, cada laminilla fue teñida en una solución de anaranjado de acridina (0.01mg/ml) y lavada con agua destilada. Posteriormente, las laminillas fueron analizadas a través de microscopio de epifluorescencia para determinar el número de células con fragmentación en el ADN nuclear como previamente se describió.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Espermatobioscopia de los eyaculados obtenidos

Los 15 eyaculados obtenidos mostraron valores de donadores normoespérmicos, es decir que los parámetros tanto del análisis macroscópico (volumen, color, licuefacción, pH y viscosidad) y microscópico (Concentración celular, movilidad, morfología y aglutinación) están por arriba de los parámetros del límite inferior de referencia establecidos por el manual para el examen de semen humano publicado por la OMS en el 2010 (ver tabla 3). Sin embargo, el promedio de la viabilidad de los eyaculados obtenidos fue menor en comparación a los límites mínimos de referencia.

Tabla. 3. Promedio y error estándar de los eyaculados obtenidos comparados con el límite de referencia inferior establecido por el manual de la OMS.

<b>Variables</b>	<b>Resultados</b>	<b>Límites de referencia inferior</b>
Volumen (ml)	2.2 ±0.10	≥ 1.5
pH	7.2±0.22	7.2-8.0
Concentración (10 <sup>6</sup> espermatozoides/ml)	185.3±31.46	≥15
Motilidad total (Progresiva y no progresiva) (%)	67.09±3.26	≥40
Motilidad progresiva (%)	55.78±6.19	≥32
Viabilidad (%)	53.58±4.23	≥58
Morfología (%)	36.01±2.30	≥4

## 7.2 Efecto de los métodos de congelación y de los medios crioprotectores sobre la movilidad celular.

La movilidad de los espermatozoides disminuye drásticamente con la vitrificación (-96°C) y ultravitrificación (-196°), sin importar el medio crioprotector que se use, en comparación al grupo control (ver figura 14). Aunque cabe señalar que la ultravitrificación disminuye significativamente la movilidad de los espermatozoides, con respecto a la vitrificación ( $P < 0.05$ ) y a los diferentes medios crioprotectores (líq. Seminal  $P = 0.0008$ , líq. Seminal/crioprotector  $P = 0.005$  y crioprotector  $P = 0.0002$ ).

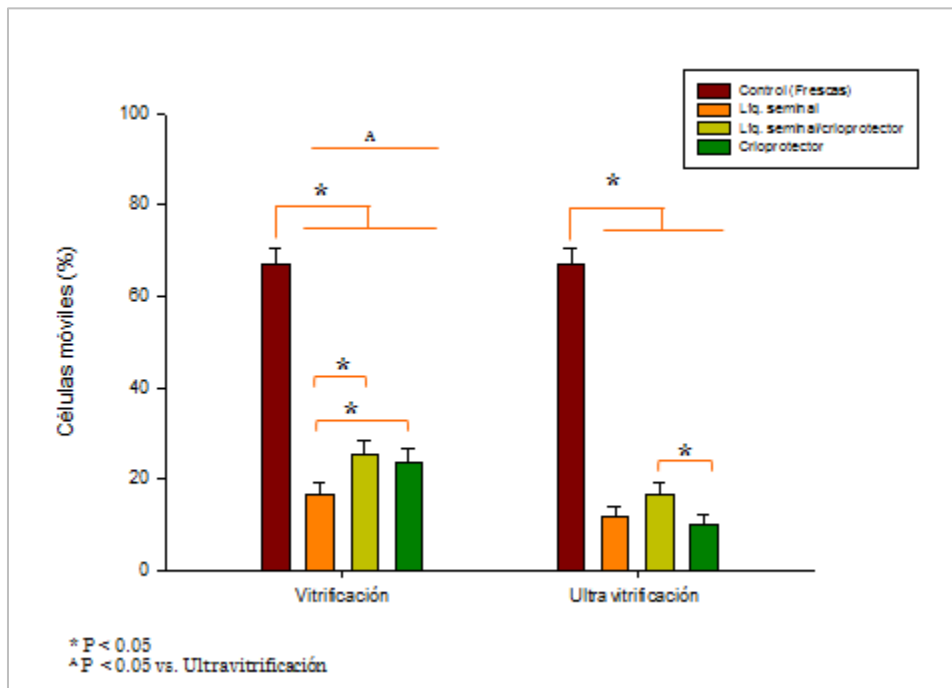


Fig. 13. Efecto de la vitrificación y ultravitrificación sobre la movilidad celular (%) comparada con el control (muestras frescas).

En el medio crioprotector Líq. Seminal/crioprotector, se recuperó la mayor cantidad de espermatozoides móviles tanto para la vitrificación y ultravitrificación; en contraste con los otros medios crioprotectores utilizados.

### 7.3 Viabilidad celular

La criopreservación de las células, ya sea por vitrificación o ultravitrificación daña la membrana de los espermatozoides comprometiendo su viabilidad. Ya que existieron diferencias significativas con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ , ver figura 15). Sin embargo, la viabilidad de los espermatozoides congelados por ultravitrificación es aún mucho menor con respecto a la vitrificación criopreservados en líq. Seminal/crioprotector ( $P = 0.03$ ) y en sólo crioprotector ( $P = 0.0003$ ). Pero en el medio Líq.Seminal/crioprotector se recuperaron más espermatozoides viables en comparación con los otros medios crioprotectores en cualquiera de los dos métodos de congelación que se utilizaron.



#### 7.4 Efecto de la congelación sobre la morfología de los espermatozoides

La morfología de las células se ve alterada al someterla en cualquiera de los métodos congelación (Vitrificación y ultravitrificación) ya que existieron diferencias significativas con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ , ver figura 16).

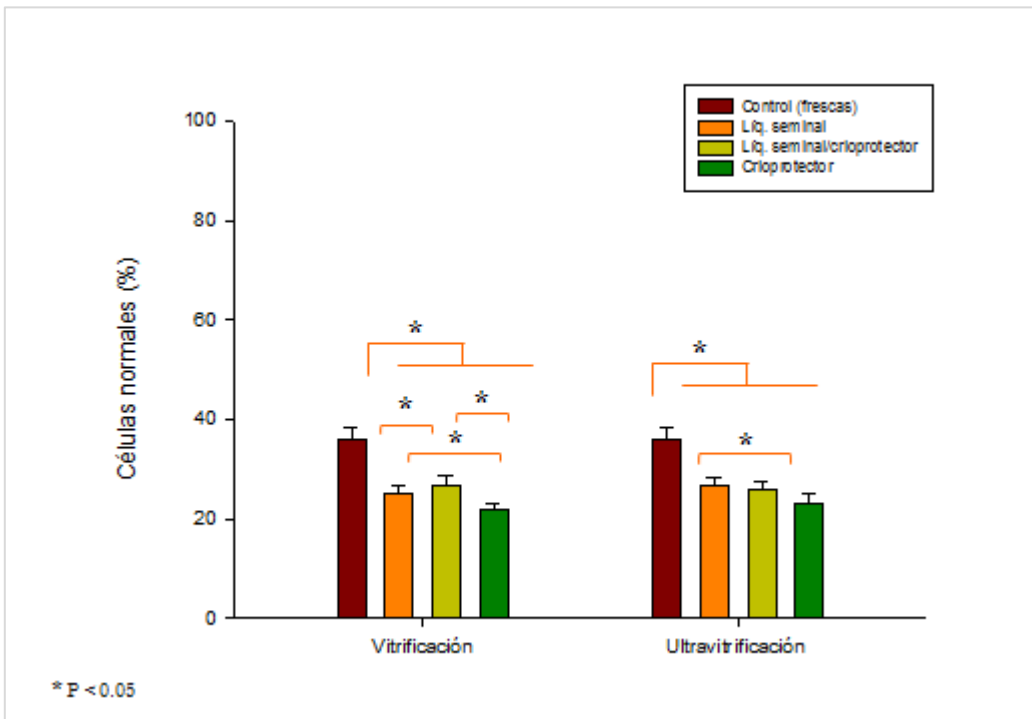


Fig. 15. Efecto de los diferentes esquemas de crioprotección sobre la morfología del espermatozoide.

Mientras tanto, los espermatozoides que fueron congelados mediante vitrificación y con sólo el medio crioprotector presentaron menor alteración en la morfología celular con respecto a los otros crioprotectores ( vs.  $P=0.002$  Líq. Seminal,  $P=0.03$  Líq. Seminal/crioprotector).

Pero los espermatozoides preservados en Líq. Seminal y Líq. Seminal/crioprotector también existen diferencias significativas ( $P= 0.02$ ). Para los espermatozoides congelados por ultravitrificación las diferencias están entre Líq. Seminal y crioprotector con una  $P=0.02$ . Cabe destacar que una de las

alteraciones que se presentaba con una mayor incidencia es la presencia de colas enrolladas o dobladas en los espermatozoides congelados (ver figura 17).

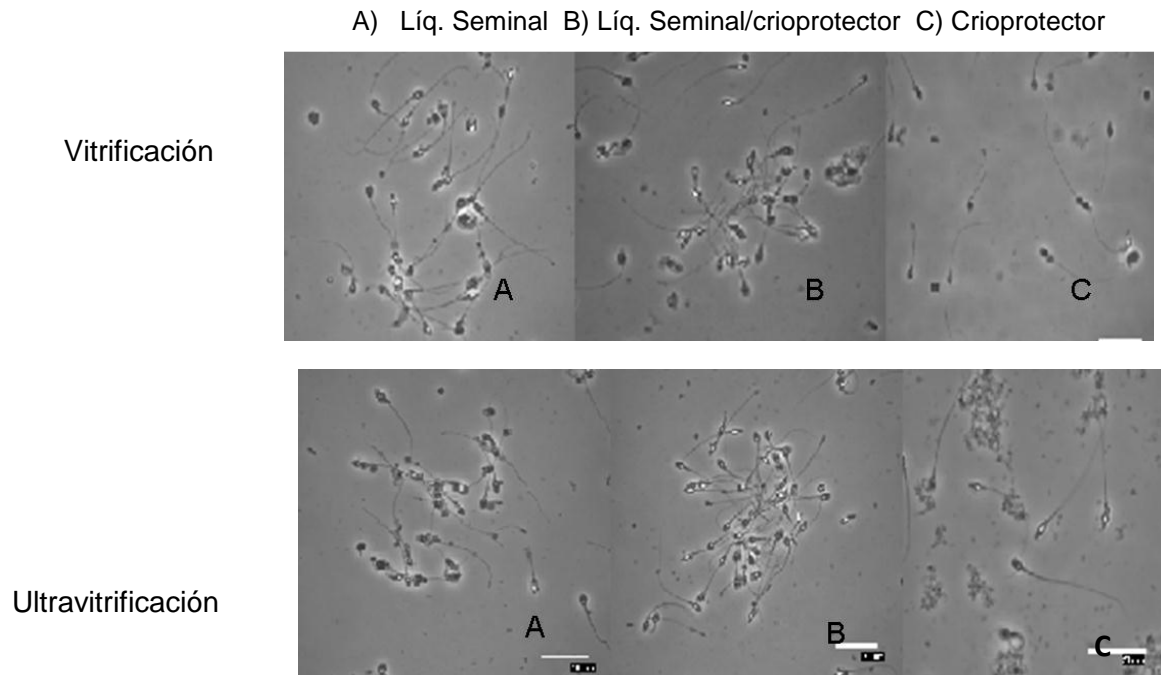


Fig. 16. Efecto del crioprotector y de los métodos de congelación sobre la morfología de los espermatozoides.

### *7.5 Determinación de la actividad metabólica por reducción del indicador rezasurin*

El número de espermatozoides congelados que presentan actividad metabólica ya sea por vitrificación y ultravitrificación, se incrementa con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ ), sin importar el medio crioprotector que se utilice (ver figura 17). Sin embargo, en los espermatozoides criopreservados por ultravitrificación, la actividad metabólica aumenta aún más con respecto a los espermatozoides congelados por vitrificación en los medios crioprotectores LÍq. Seminal ( $P = 0.04$ ) y líq. Seminal/crioprotector ( $P = 0.03$ ).

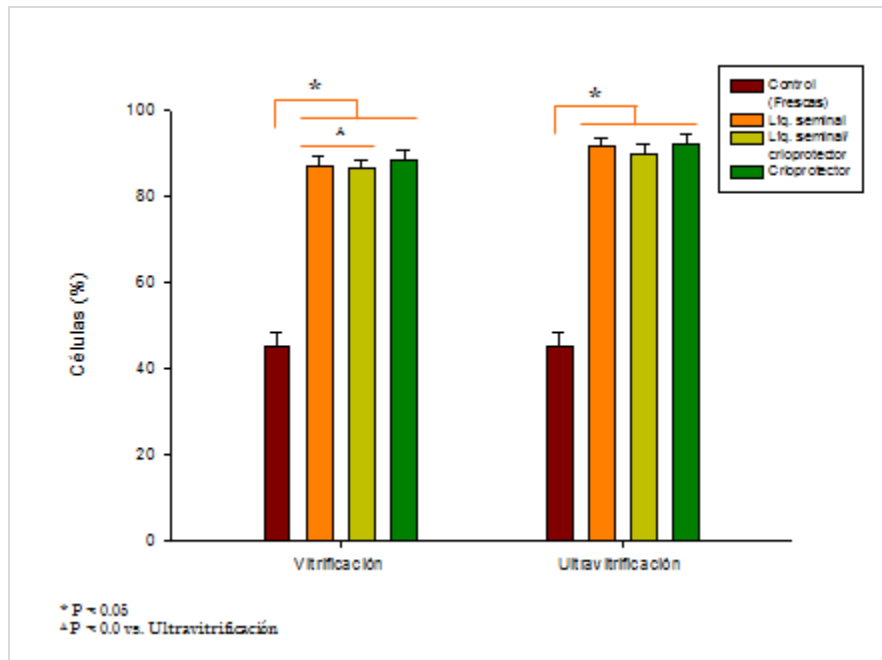


Fig. 17. Efecto de los diferentes esquemas de criopreservación sobre la actividad metabólica de los espermatozoides.

### 7.6 Efecto de la criopreservación sobre la integridad del ADN del espermatozoide

La integridad del ADN espermático se afecta severamente con el uso de métodos de congelación y sin importar el medio crioprotector que se use, ya que los resultados arrojaron diferencias significativas con respecto al grupo control de acuerdo a los resultados observados por la tinción anaranjado de acridina ( $P < 0.05$ , ver figura 18) y prueba cometa ( $P < 0.05$ , ver figura 19). Es importante mencionar que la identificación de fragmentación de ADN espermático mediante prueba cometa es mucho más precisa y sensible con respecto a la tinción AO, ya que ésta última puede presentar falsos positivos por un exceso de la tinción, tiempo de observación de la muestra, etc.

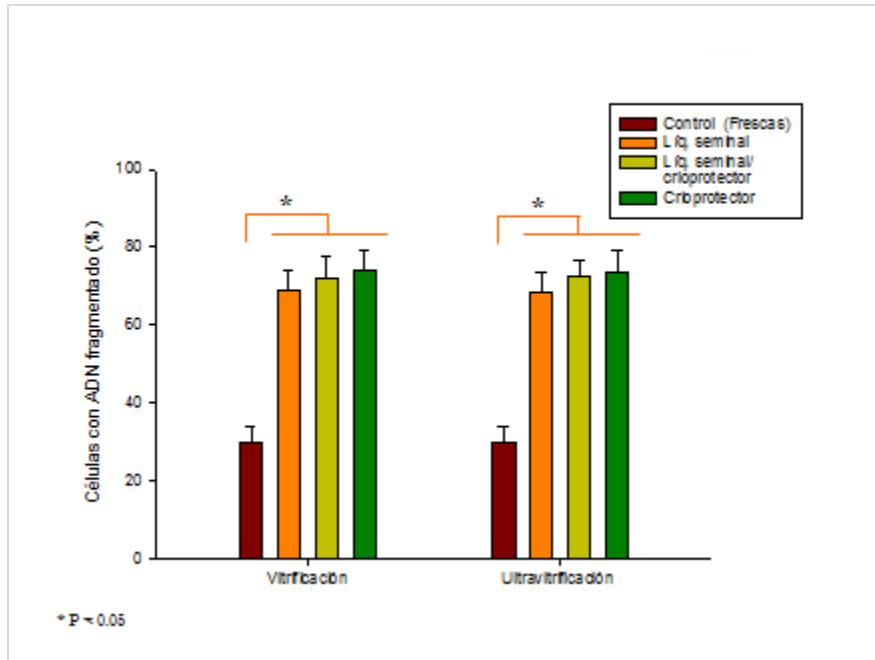


Fig. 18. Efecto de los diferentes esquemas de crioprotección sobre la integridad del ADN (Tinción con anaranjado de acridina).

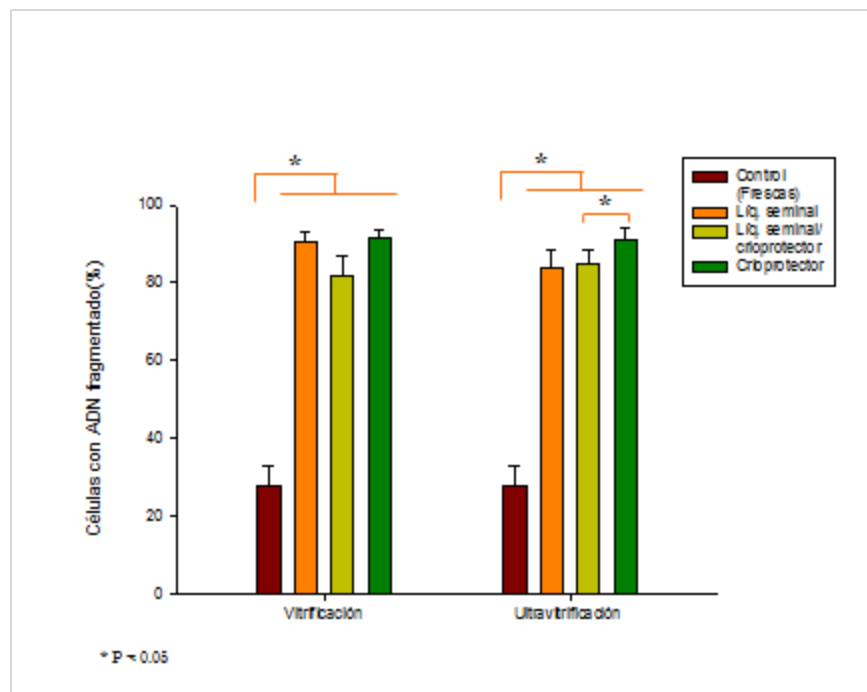


Fig. 19. Efecto de los diferentes esquema de crioprotección sobre la integridad del ADN (Prueba cometa).

### 7.7 Asociación entre la morfología y la fragmentación del ADN espermático mediante prueba cometa.

En el análisis de regresión entre morfología y fragmentación de ADN espermático no mostró diferencias significativas en cualquier medio crioprotector tanto para vitrificación y ultravitrificación. Por lo que, un espermatozoide puede presentar excelente morfología pero su ADN espermático puede estar dañado.

En el método de congelación por vitificación y el medio crioprotector Líq. Seminal los resultados arrojaron la ecuación de la regresión  $y=66.15+0.96(x)$  ( $F_0= 4.26$ ,  $F_c=4.66$ ). Con respecto al Líq. Seminal/crioprotector, la ecuación de la regresión  $y=78.69+0.11(x)$  ( $F_0= 0.119$ ,  $F_c=4.66$ ). Y finalmente para el crioprotector la ecuación de la recta  $y=81.16+0.436(x)$  ( $F_0= 0.131$ ,  $F_c=4.66$ , ver figura 21). Según del analisis de la regresión, no existe asociación entre la morfología normal de los espermatozoides y el aumento de la fragmentación de ADN espermático en cualquier medio crioprotector y congelados por vitrificación.

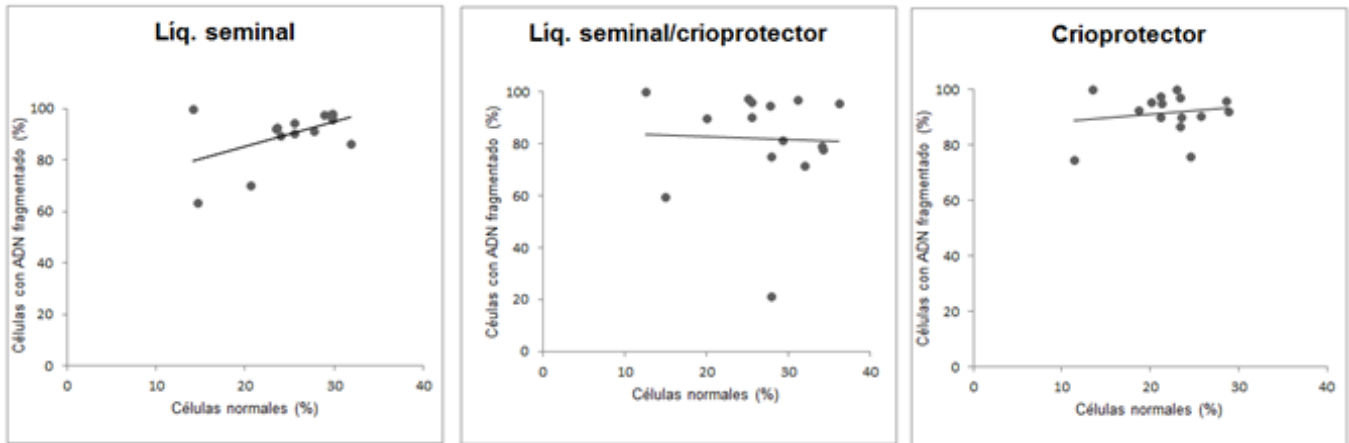


Fig. 20. Asociación entre la morfología de células normales y la fragmentación de ADN espermático, en los diferentes medios crioprotectores congelados mediante vitrificación.

Los espermatozoides congelados por ultravitrificación preservados en líq. Seminal indicaron la ecuación de la regresión  $y=81+0.1(x)$  ( $F_0=0.02$ ,  $F_c=4.66$ ). La combinación de líquido seminal y crioprotector, la ecuación de la regresión  $y=83.02+0.7(x)$  ( $F_0= 0.14$ ,  $F_c=4.66$ ). Y finalmente el crioprotector mostró la ecuación de la regresión  $y= 85.83+0.247(x)$  ( $F_0= 0.389$ ,  $F_c=4.66$ ). En conclusión, el análisis de regresión no mostró asociación entre la morfología y la fragmentación de ADN espermático en cualquiera de los medios crioprotectores utilizados.

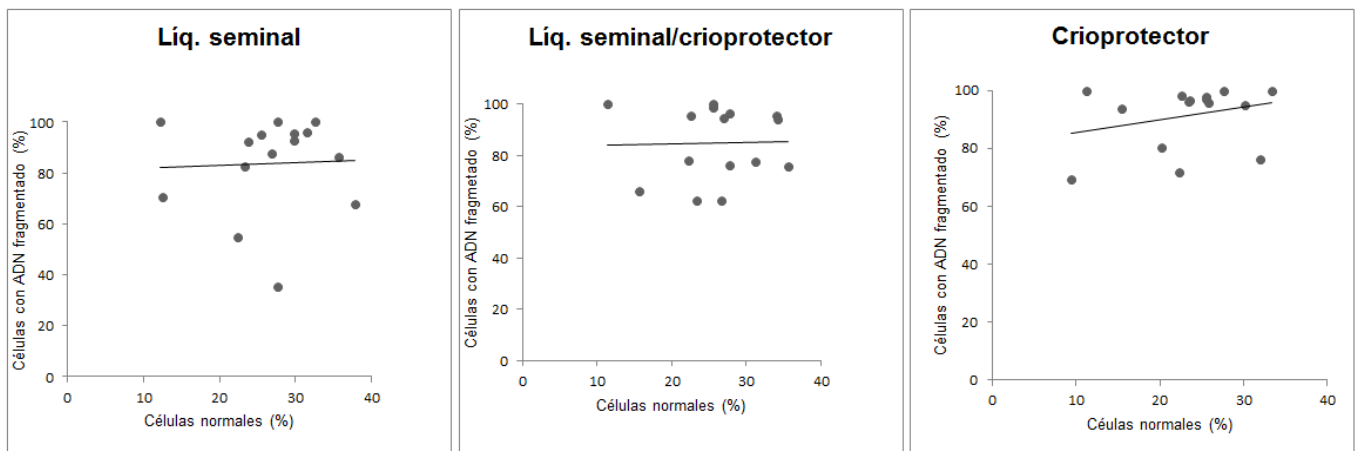


Fig. 21. Determinación de la asociación de las células morfológicamente normales y la fragmentación de ADN espermático, preservados bajo diferentes medio crioprotectores y congelados por ultravitrificación.

### 7.8 Asociación entre el aumento de la actividad metabólica y la fragmentación del ADN espermático mediante prueba cometa.

El análisis de regresión con la actividad metabólica de las células y la fragmentación de ADN espermático indicó que no existe asociación entre estas dos variables, en los diferentes medios crioprotectores y los métodos de congelación.

En la vitrificación con el medio crioprotector líquido seminal la ecuación de la regresión  $y=119.9+(-0.34)(x)$  ( $F_0= 1.48$ ,  $F_c=4.66$ ). Por el contrario en la

combinación de líquido seminal y crioprotector la ecuación  $y=41.45+0.46(x)$  ( $F_0=0.386$ ,  $F_c=4.66$ ). Y Finalmente en el medio crioprotector la ecuación de la regresión  $y=96.11+(-0.0873)$  ( $F_0=0.1623$ ,  $F_c=4.66$ ). En resumen la actividad metabólica no determina la fragmentación de ADN espermático en cualquier medio crioprotector.

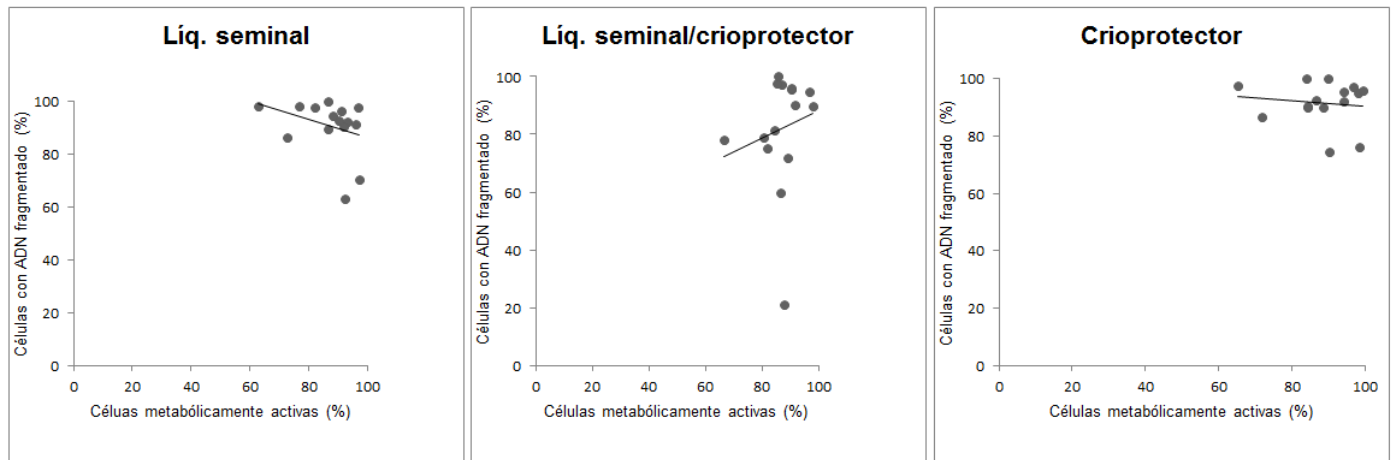


Fig. 22. Asociación entre el aumento de la actividad metabólica y los índices altos de fragmentación de ADN espermático en diferentes esquemas de crioprotección preservados por vitrificación.

En la ultravitrificación los espermatozoides congelados en líquido seminal la ecuación de la regresión fue de  $y=116.36+(-0.35)$  ( $F_0= 2.40$ ,  $F_c=4.66$ ). En líquido seminal y crioprotector la ecuación de la regresión fue de  $y=76.23+0.06(x)$  ( $F_0=0.20$ ,  $F_c=4.66$ ). Y finalmente los espermatozoides preservados en crioprotector únicamente la ecuación de la regresión fue  $y=122.80+0.33(x)$  ( $F_0= 0.951$ ,  $F_c=4.66$ , ver figura 24). En conclusión la fragmentación de ADN espermático no esta determinada por el aumento de la actividad metabólica en cualquier medio crioprotector.

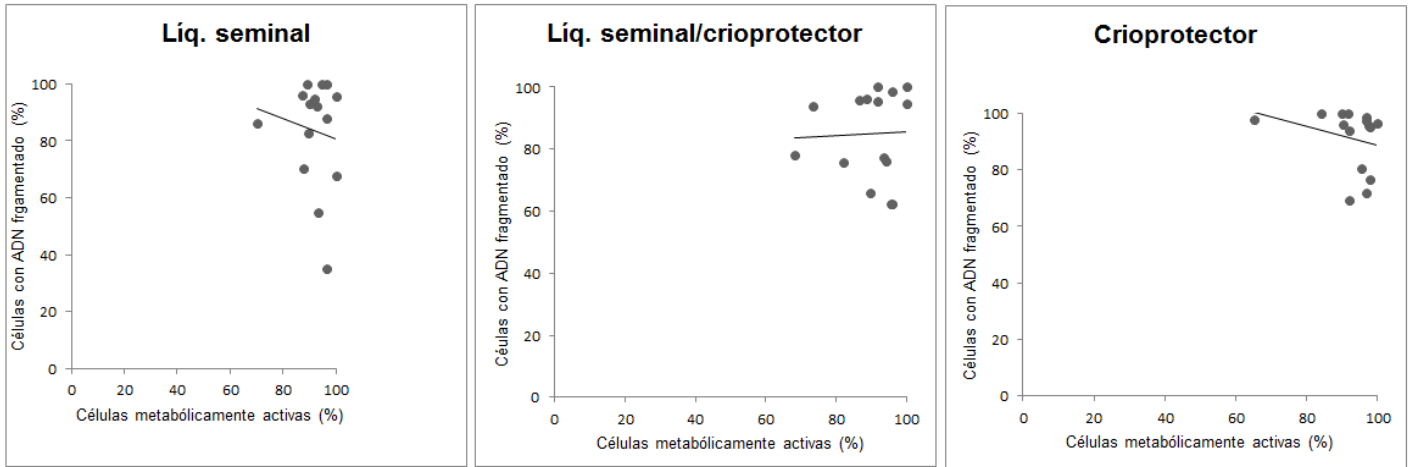


Fig. 23. Efecto del aumento de la actividad metabólica sobre la fragmentación de ADN espermático en diversos medios crioprotectore y congelados por ultravitrificación.

## 8. DISCUSIÓN

La criopreservación de espermatozoides es una de las técnicas utilizadas con mayor frecuencia por hombres que desean preservar sus gametos cuando su fertilidad esta amenazada. Sin embargo, aún no se han determinado los métodos de congelación adecuados y los medios crioprotectores óptimos que se pueden utilizar para recuperar la mayor cantidad de células viables y móviles, pero sobre todo mantener la integridad del ADN de los espermatozoides.

La movilidad de los espermatozoides se reduce en promedio en un 75% en cualquiera de los métodos de criopreservación y de los diferentes medios crioprotectores en comparación con las muestras frescas. Isachenko y colaboradores en el 2004, observaron que la movilidad es una de las variables principalmente afectadas por la criopreservación de manera crucial, aunque el mecanismo de deterioro de espermatozoides y su etiología mecánica y/o fisicoquímicos siguen sin estar claros. Sin embargo, en nuestro proyecto observamos que en los espermatozoides vitrificados en líquido seminal/crioprotector obtuvieron el mayor porcentaje de recuperación de células móviles.

La viabilidad de los espermatozoides también se afecta al someterlos a temperaturas extremas de la vitrificación (-96°C) y ultravitrificación (-196°) ya que la integridad de la membrana se afecta por la formación de cristales de hielo intracelulares y la disolución de éstos, deshidratación celular, daño osmótico durante la adición o eliminación de agentes crioprotectores, y el efecto de la elevada concentración de solutos dentro de la célula o cambios en la permeabilidad de la membrana durante el proceso congelación y descongelación (Gao y Critser, 2000; Gilmore, *et al.*, 2000). Aunque cabe señalar que en nuestros experimentos los espermatozoides congelados por vitrificación y en el medio Líquido seminal/crioprotector a base de yema de huevo se recuperaron una cantidad superior de células viables en comparación a los otros medios crioprotectores empleados.

En el medio crioprotector líquido seminal/crioprotector se recuperaron las tasas más altas de movilidad y viabilidad con respecto a los otros medios crioprotectores utilizados: líquido seminal y crioprotector por separado. La combinación de estas dos sustancias tuvo un efecto menos perjudicial para las células comparado con el uso éstas por separado. El líquido seminal contiene numerosos antioxidantes y enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, que eliminan a las especies reactivas de oxígeno y algunas proteínas como albumina y taurina (Donnelly, 2001). Además, la yema de huevo contiene lipoproteínas, fosfolípidos, colesterol y otros componentes; que ayudan a la célula a reducir los efectos nocivos sobre la membrana que se producen durante el congelamiento rápido (Kiran, *et al.*, 2004). Gamzu y colaboradores (1997) explicaron que puede haber un intercambio de lípidos entre las membranas de los espermatozoides con los fosfolípidos y de las proteínas de baja densidad de la yema de huevo que alteran la membrana celular de los espermatozoides así como la composición molecular y ayuda a mantener su fluidez. El uso del medio crioprotector es indispensable para proteger a los espermatozoides de las criolesiones que suceden durante la criopreservación.

Por otro lado, la morfología de los espermatozoides se afecta con los diferentes métodos de congelación y los diferentes crioprotectores, haciendo el comparativo con las muestras frescas (grupo control), los espermatozoides anormales presentaban colas enrolladas, causada por los efectos osmóticos de los cambios de temperatura, induciendo el daño a la región acrosomal y con ello a la integridad funcional y estructural del espermatozoide (O'Connell, *et al.*, 2002).

La vitrificación y ultravitrificación, sin importar en medio crioprotector en el cual los espermatozoides fueron preservados, afectan a las células haciendo que aumenten su actividad metabólica. El aumento de la actividad metabólica de las células durante la criopreservación puede ser por la generación de especies reactivas de oxígeno y como consecuencia de esto la peroxidación lipídica; además, los antioxidantes y las enzimas antioxidantes disminuyen, induciendo el daño las

estructuras del citoesqueleto, los cuales favorecen a la activación de la apoptosis celular (Said *et al.*, 2004).

Los métodos de congelación inducen fragmentación de ADN espermático, como ha sido observado por las pruebas de tinción con anaranjado de acridina y la prueba cometa, ya que los promedios post-congelación aumentan drásticamente tanto en vitrificación y ultravitrificación y empleando cualquiera de medios crioprotectores en comparación con las muestras frescas. Cabe señalar que la prueba cometa es un test mucho más sensible y preciso para la identificación de la fragmentación de ADN con respecto a la tinción anaranjado de acridina, ya que muestra un halo formado en caso de que exista fragmentación de ADN. Por el contrario, la tinción anaranjado de acridina puede cambiar con el tiempo de exposición a la luz, la preparación de buffer, la presión con la que se realiza el frotis, etc. Donnelly y colaboradores (2001) observaron que la congelación/descongelación de los espermatozoides de hombres tanto fértiles como infértiles, conduce a un daño significativo de la cromatina así como los efectos significativos sobre la morfología de los espermatozoides y la integridad de la membrana. Otro estudio demostró que la susceptibilidad a la desnaturalización del ADN en hombres infértiles es mayor que en hombres fértiles ya que muestran un aumento de la inestabilidad del ADN y por lo tanto son más propensos a la desnaturalización por estrés. Ésta desnaturalización puede ser inducida por varios tratamientos, incluyendo la congelación (Isachenko, *et al.*, 2004). A pesar de esto, los ovocitos tienen la capacidad de reparar una pequeña cantidad de daño en el ADN del espermatozoide, pero esto es insuficiente para apoyar el desarrollo posterior del embrión (Ahmadi, 1999), y el daño del ADN puede conducir a la disminución de las tasas de concepción o falla en la concepción (Agarwal y Allamaneni, 2005). El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado también se ha correlacionado negativamente con las tasas de fertilización *in vitro* y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Evenson, *et al.*, 2002).

El análisis de regresión indicó que no existe relación entre la morfología y el aumento de fragmentación de ADN espermático post-congelación, el cual fue identificado por prueba cometa. Estos resultados revelan que un espermatozoide puede presentar una morfología correcta pero también puede tener altos índices de fragmentación de ADN espermático. Por este motivo se propone que se incluyan las pruebas de fragmentación como una variable más dentro de la espermatobioscopia. Donnelly y colaboradores (2001), en su estudio han encontrado que no existe una correlación significativa entre la morfología de los espermatozoides y la integridad del ADN, ya sea en el semen o muestras de espermatozoides preparados de hombres fértiles e infértiles. Por lo tanto, las características morfológicas de un espermatozoide humano no parecen ser indicativos de la calidad del ADN de espermatozoide, es decir, el fenotipo de los espermatozoides no refleja el genotipo de la célula (Donnelly, *et al.*, 2001).

Por otro lado, el análisis de regresión lineal entre el aumento de la actividad metabólica y el aumento de la fragmentación de ADN espermático no mostró diferencias significativas, por lo que no existe asociación directamente entre estas dos variables. Sin embargo, el aumento de la actividad metabólica podría deberse a la producción de factores apoptóticos y a la generación de especies reactivas de oxígeno, que dañan al ADN de las células. Las especies reactivas de oxígeno dañan directamente al ADN del espermatozoide, comprometiendo la contribución genómica paterna para el embrión (Tremellen, 2008) y puede conducir a anomalías en la descendencia, incluyendo cáncer de la niñez y la acondroplasia. También los ROS dañan la membrana de los espermatozoides, que a su vez reduce la motilidad de los espermatozoides y la capacidad de fusionarse con el ovocito (Aitken, *et al.*, 2001a; Aitken, *et al.*, 2003b).

Por otra parte, los ROS son importantes mediadores de la apoptosis, y como consecuencia, se traduce en altos porcentajes de rompimiento de cadena sencilla o doble del ADN (Said, *et al.*, 2004). La integridad del ADN de los espermatozoides de los mamíferos es de vital importancia para la contribución genética a la descendencia paterna normal. El énfasis en la evaluación genómica

ha aumentado recientemente debido a los estudios que se correlacionaron el grado de daño en el ADN con diversos índices de fertilidad, incluyendo las tasas de fertilización, desarrollo embrionario, implantación, embarazo y tasas de infantes nacidos vivos (Henkel, et al., 2004; Agarwal y Amellani, 2004; Tomsu, et al., 2002).

Las alteraciones morfológicas y fisiológicas del espermatozoide causadas por criopreservación disminuyen la duración de vida, la capacidad para interactuar con el aparato reproductor femenino, y por lo tanto el potencial de fertilización. Por lo tanto, la evaluación de la lesión criogénica es un factor clave e importante para lograr mejores resultados de en la criopreservación. Cabe señalar que el éxito de fertilización no debe atribuirse solamente a la vitalidad del espermatozoide o a la morfología, sino que se debe de tomar en cuenta un factor importante como es la integridad del ADN espermático, ya que muchas clinicas de reproducción asistida sobre estimán a esta variable dejando a un lado los mecanismo de selección natural espermática y permitiendo incrementar las posibilidades de que un espermatozoide pueda fertilizar a un ovocito con material genómico alterado .

Cuando un espermatozoide con un severo daño en su ADN fertiliza a un ovocito, el embrión puede verse alterado en su desarrollo o implantarse en el útero y provocar un aborto espontáneo en un estadio más tardío. De igual manera, cuando un espermatozoide con un mínimo daño en su ADN es utilizado, el desarrollo fetal puede verse afectado más tarde y puede dar lugar a un niño con anomalías congénitas.

Por todo lo argumentado anteriormente, se propone realizar más estudios sobre los método de congelación y los medios crioprotectores ya que la criopreservación exitosa de células depende de la velocidad de congelación, el medio en el que las células se congelan y el medio crioprotector que se utiliza. Con la finalidad de que los pacientes que necesitan recurrir a este tipo de técnicas obtengan mejores y precisos resultados para que en un futuro puedan procrear y dejar descendencia.

## 9. CONCLUSIÓN

La criopreservación reduce la calidad del semen, independientemente de la metodología que se utilice: ya sea por vitrificación o ultravitrificación, modificando las características morfológicas y fisiológicas de los espermatozoides, pero sobre todo altera la integridad del ADN.

La viabilidad celular de las muestras disminuye tanto para vitrificación como para ultravitrificación, pero con el uso del medio crioprotector líquido seminal/crioprotector se recuperaron las tasas más altas de células viables, en comparación con los otros medios crioprotectores y en cualquiera de los métodos de congelación utilizados en este estudio.

La movilidad celular, se afectó dramáticamente con las técnicas de congelación, pero cabe destacar que con el uso de la combinación de líquido seminal y crioprotector a base de yema de huevo se recuperaron la mayor cantidad de células móviles con comparación con los otros crioprotectores utilizados ya sea para vitrificación o ultravitrificación.

La morfología de células también se afecta, y esto se debe principalmente por la presencia de colas enrolladas en su mayoría, tanto para vitrificación como para ultravitrificación. Pero nuevamente en el medio crioprotector líquido seminal/crioprotector a base de yema de huevo los espermatozoides presentaron menor alteración.

La actividad metabólica de las células aumenta al someter a los espermatozoides bajo los procedimientos de congelación durante un mes, bajo los diferentes medios crioprotectores.

Por otro lado, la fragmentación de ADN espermático se incrementa drásticamente tanto para vitrificación como para ultravitrificación, en cualquiera de los medios crioprotectores utilizados.

El medio crioprotector líquido seminal y la combinación del crioprotector a base de yema de huevo presentó la tasas más altas de recuperación de células viables, células móviles y células con morfología normal, en comparación con el uso de líquido seminal o crioprotector tanto para vitrificación como ultravitrificación.

Se deben realizar trabajos de investigación sobre la congelación celular y los medios crioprotectores adecuados para no dañar al espermatozoide y se puedan utilizar la células para fines de reproducción asistida.

## 10. PERSPECTIVAS

Realizar experimentos con diferentes medios crioprotectores y a diversas concentraciones, congelando las muestras en un determinado tiempo. Posteriormente después de la descongelación evaluar las características vitales de los espermatozoides así como la fragmentación del ADN espermático en diferentes lapsos de tiempo, con la finalidad de evaluar los grados de fragmentación. Posteriormente, utilizar espermatozoides congelados y evaluar la calidad de fertilización recurriendo a técnicas de reproducción asistida y monitorear a los embriones en su desarrollo.

El aumento de la actividad metabólica se asocia con la presencia de factores apoptóticos, hacer un análisis de éstos factores y asociarlos con la fragmentación de ADN espermático. Así como también identificar la presencia de ADN fragmentado a nivel mitocondrial de los espermatozoides.

Realizar un experimento en un organismo murino, por el objetivo de tener individuos con las variables controladas y con ello obtener datos más precisos del efecto de la criopreservación y de los medios crioprotectores en las características morfológicas y fisiológicas del espermatozoide.

Proponer una técnica precisa, eficaz y de bajo costo para la identificación de la fragmentación de ADN espermático y que esta variable tan importante se integre como una más dentro de los valores de una espermatozobioscopia.

## 11. Trabajos citados

- Agarwal, A. & Allamaneni, S.S. (2005). Sperm chromatin defects in the etiopathogenesis of male infertility. *Revista Internacional de Andrología*, 3, 31-37.
- Agarwal, A. & Allamaneni, S.S. (2004). The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *Minerva Gynecological*, 56,235–45.
- Agarwal, A. & Newton, R.A. (1991).The effect of cancer on semen quality after cryopreservation of sperm. *Andrology*, 23, 329-332.
- Agarwal, A. & Tamer M.S. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction*, 9,331-341.
- Agarwal, A., Prabakaran, S. & Allamaneni S. (2006). What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology*; 67, 2–8.
- Agarwal, A., Shekarriz, M., Sidhu, R.K. & Thomas, A.J (1996). Value of clinical diagnosis in predicting the quality of cryopreserved sperm from cancer patients. *Journal Urology*, 155, 934-938.
- Ahmadi, A, & Ng, S.C. (1999).Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*, 284, 696–704.
- Aitken, R.J. & Krausz, C. (2001)a. Oxidative stress. DNA damage and the Y chromosome. *Human Reproduction*, 122,497–506.
- Aitken, R.J., Baker, M.A. & Sawyer, D. (2003)b. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproduction Biomedicine Online*, 65–70.
- Álvarez, J.G., Sharma, R.K., Ollero, M., Saleh, R., Lopez, M., Thomas, A.J., Jr, Evenson, D.P.& Agarwal, A. (2002). Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, 78, 319-329.
- American Cancer Society. Cancer facts and figures 2002, American Cancer Society statistics. p. 5–18. Available at: [http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT\\_1X\\_cancerFacts\\_Figures\\_2004.asp](http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1X_cancerFacts_Figures_2004.asp).
- Aravindan, G. R., Bjordahl, J., Jost, L.K. & Evenson, D.P. (1997). Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA

- strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 7, 231-237.
- Arnon, J., Meirou, D., Lewis-Roness, H. & Ornoy, A. (2001). Genetic and effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Human Reproduction*, 7, 394-403.
- Ávila, L., Bacter, J I., Madero, M.D.,López, León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, G., Gómez, C., Lozano, J. M. & Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 4, 291-300.
- Balhorn, R., Cosman, M., Thornton, K., Krishnan, V.V., Corzett, M., Bench, G., Kramer, C., Lee, J., Hud, N.V. & Allen, M. (1999). Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. *The Male Gamete: from Basic Knowledge to Clinical Applications*, 8, 55-70.
- Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune H. & Guérin, J.F.(2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, 5 1023-1028.
- Boiso, I. (2001).Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*;4, 1-18.
- Borini A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., .Bonu, M.A., .Fava, L., Flamigni, C. & Coticchio, G., (2006). Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction*, 11, 2876-2881.
- Brotherton, J. (1990). Cryopreservation of human semen. *Andrology*, 2, 181–195.
- Cai, L., Hales, B.F. and Robaire, B. (1997) Induction of apoptosis on the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biology of Reproduction*, 56, 1490-1497.
- Candelas, D. (2014). Embriología humana. Primera edición. Instituto Politécnico nacional.
- Chatterjee, R., Haines, G.A., Perera, D.M., Goldstone, A. & Morris, I.D. (2000) Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukemia. *Human Reproduction*, 15, 762-766.

- Cohen, P.E. & Pollard, J.W. (1995) Cytokines and growth factors in reproduction. In Bronson, R. (ed.), *Reproductive Immunology*. Blackwell Science, Cambridge, MA.
- Comhaire, F.H., Mahmoud, A.M., Depuydt, C.E., Zalata, A.A. & Christofe, A.B (1999). Mechanism and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's view point. *Human Reproduction*, 5, 393-398.
- Dadoune, J.P\_. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Micros. Res. Tech*, 1,56-75.
- D'Occhio, M.J., Hengstberger, K.J., & Johnston, S. D.(2007). Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal Reproduction Science*, 101,1-17.
- Donnelly, E.T., Steele, E.K., McClure, N. & Lewis, S.E. (2001). Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction*, 16, 1191-1199.
- Duran, E.H., Morshedi, M., Taylor, S. & Oehninger, S. (2002) Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction*, 12, 3122-3128.
- Enciso, L. (2009). La fragmentación del ADN en espermatozoides de mamíferos. Tesis doctoral, *Universidad Autónoma de Madrid*.
- Evenson, D.P., Jost, L.K., Corzett, M.& Balhorn, R. (2000) Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *Journal of Andrology*, 21, 739-746.
- Evenson, D.P., Larson, K. L., & Jost, L. K.(2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with the other techniques. *Journal of Andrology*, 23, 25-43.
- Evenson, D. P, Darzynkiewicz, Z., Jost, L., Janca, F. & . Ballachey, B. (1986). Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis, *Cytometry*, 7,45-53.

- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65,979–991.
- Fahy, G. M. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 407-426.
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R. & Alvarez, J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology*, 24, 59-66.
- Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Wyrobek, A.J., Rempel, D.M. & Ames, B.N. (1996). Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutation Research*, 351, 199-203.
- Gamzu, R., Yogev, L., Botchan, A., Amit, A., Lessing, J.B. & Lichtenberg, D. (1997). Effect of sperm preparation with TEST yolk buffer on sperm binding capacity under hemizona assay conditions. *Andrología*, 29, 17-21.
- Gao, D. & Critser J. K. (2000). Mechanism of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal*, 4, 87–196.
- Garcia-Macias M., M.-P. F. (2006). Assessment of chromatin status (SCSA1) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology*, 8, 1921-1930.
- Gilmore, J. A., Liu, J., Woods, E. J., Peter, A. T. & Critser, J. k. (2000). Cryopreservation agents and temperature effects on human sperm membrane permeabilities:convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction*, 15, 335–343.
- Gorczyza, W., Gong, J., & Darzynkiewicz, Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research*, 53, 45-51.
- Godoy, H., Maman, A., Ponce, P., Lozano, Gonzáles, L., Cedillo, L. & Mera, M. (2013). Evaluación de los parámetros seminales en parejas con infertilidad. *Revista Mexicana de Reproducción*, 5:178-185.
- Grimes Jr. SR., V.-W. J. (1997). Regulation of transcription. *Molecular Biology Reports*, 84 175.

- Guzick D., Sullivan, M., Adamson, D. G., Cedar, M., Falk, R., Peterson, E., & Steinkampf, M. (1998). Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 70, 207-213.
- Hammadeh, M. E., Greiner, S., Rosenbaum, P. & Shmidt, W.(2001). Comparison Between Human Sperm Preservation Medium and TEST-Yolk Buffer on Protecting Chromatin and Morphology Integrity of Human Spermatozoa in Fertile and Subfertile Men After Freeze-Thawing Procedure. *Journal of Andrology*, 22, 1012-1018.
- Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C. & Menkveld R. (2004). Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility*, 81, 965–972.
- Holt, V. W. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 3-22.
- Holstein, A. F., Schulze, W. & Davidoff, M.(2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1, 1-16.
- Horta, F., Madariada, M, García, A., Harte, S. & Smith, S. (2011). Association of age with sperm DNA fragmentation. *Revista Médica de Chile* , 139, 306-312.
- Hughes, C. M, McKelvey, M. V. J. & Lewis, S. E.(1999). Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays. *Mutagenesis*, 15,71-75.
- Isachenko, V. Isachenko, E., . Katkov, I. I., Montag, M., Dessole, S., Nawroth, F. & Van der Ven, H. 2004). Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. *Biology of reproduction* , 71, 1167–1173.
- Kretser D. M., Loveland, L.K., Meinhardt, A., Simorangkir, D. & Wreford, N.(1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction*,13, 1-8.
- Kiran, P., Nallella, M. D., Rakesh, K., Sharma, Ph.D., Shyam, S. R. & Allamaneni, M.D. (2004). Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and Sterility*, 82, 913-918.

- Knobil, E., & Neill, J. (2006). *Physiology of Reproduction* (Tercera edición., Vol. 1). Estados Unidos de America: Elsevier.
- Kobayashi, H., Larson, K., Sharma, R.K., Nelson, D.R., Evenson, D.P., Toma, H., Thomas, A.J., Jr & Agarwal, A. (2001) DNA damage in cancer patients before treatment as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, 75, 469-475.
- Kukis, A. (1992). Yolk lipids. *Biochim Biophys Acta* , 24, 205–222.
- Kunzle, R., Mueller, M.D., Hanggi, W., Birkahuser, M.H., Drescher, H. & Bersinger, N.A. (2003) Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertility and Sterility*, 79, 287-291.
- Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A. & Maisse, G. (2001) Effects of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60, 397-404.
- Larson K., De Jonge, C J., Barnes, A. M., Jost, L. K. & Evenson, D. P. (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human Reproduction*, 15, 17-22.
- Li, H., Jian, Y., Rajpurkar, R., Dunbar, J. and Dhabuwala, C.B. (1999). Cocaine induced apoptosis in rat testes. *Journal of Urology*, 162, 213-216.
- McPherson, S.M.G. y Longo, F.J. (1993) Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *European Journal Histopathology.*, 37, 109- 128.
- McPherson, S.M.G.y Longo, F.J. (1992) Localization of Dnase I hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Molecular Reproduction and Development*, 31, 268-279.
- Manicardi, G.C., Bianchi, P.G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U. and Sakkas, D. (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and it relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biology Reproduction*, 52, 864-867.

- Mascarenhas, M. N., Flaman, S. R. & Boerma, M. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLOS Medicine*, 1-12.
- Mascarenhas, M. N. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLOS Medicine*, 9-12.
- Massart, A. L. (2012). Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian Journal of Andrology*, 40-48.
- Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365.
- Nallella, K.P., Sharma, R.K., Allamaneni, S.S, Aziz, N & Agarwal A. (2004). Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and Sterility*, 4, 913-918.
- Nawroth, F. R. (2005). Cryopreservation in Assisted Reproductive Technology: New Trends. *Seminars in Reproductive Medicine* , 4, 325-335.
- Nieschlag. (2000). Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction. *Andrology*, 1-8.
- O'Connell, M., McClure, N. & Lewis S. (2002). The effect of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17, 704–709.
- Oehninger, S. D. (2000). Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Molecular Cell Endocrinology*, 3-10.
- Ondrizek, R., Chan, P.J., Patton, W.C. & King, A. (1999) An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. *Fertility and Sterility*, 71, 517-522.
- Ollero, M., Gil, Guzmán, López, M., Sharma, R., Agarwal, A., Larso, K., Evenson, D., Thomas, A & Alvaréz, J. (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reproduction*, 9, 1912-1921.

- Paoli, D., Lombardo, F., Lenzi, A. & Gandini L. (2014) Sperm Cryopreservation: Effects on Chromatin structure. *Genetic Damage in human spermatozoa*. 9, 137-150.
- Potts, R.J., Newbury, C.J., Smith, G., Notarianni, L.J. & Jefferies, T.M. (1999)a. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation Research*, 423, 103-111.
- Potts, R.J., Jefferies, T.M. and Notarianni L.J. (1999)b. Antioxidant capacity of the epididymis. *Human Reproduction*, 14, 2513-2516.
- Prins, G. & Weidel, L. (1986). Comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 1, 147-149.
- Reichart, M., Kahane, I & Bartoov, B. (2000) In vivo and in vitro impairment of human and ram sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmitted *Ureaplasma urealyticum* infection. *Biology of Reproduction*, 63, 1041-1048.
- Ruiz, J., Correa, J. E. & Martinez, M (2010). Vitrification of bovine oocytes and its use in the parthenogenetic. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42, 79-83.
- Said, T.M., Paasch, U., Glander, H.J. & Agarwal, A. (2004) Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction*, 10, 39–51.
- Saito, K., Suziki, K. & Iwasaki, A. (2005). Sperm cryopreservation before cancer chemotherapy helps in the emotional battle against cancer. *Cancer*, 104, 521-524.
- Sakkas D., M. E. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*, 31–37.
- Senger, P. (1999). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Washington: Current Conceptions Inc.
- Steele, E.K., McClure, N. & Lewis, S.E. (2000) Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA. *Fertility and Sterility*, 74, 450-453
- Sigman, M. & Lopes, L. (1993) The correlation between round cells and white blood cells in the semen. *Journal Urology*, 388, 573-574.

- Siciliano, L., Tarantino, P., Longobardi, F., Rago, V., De Stefano, C. & Caprino, A. (2001) Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *Journal Andrology*, 22, 798-803.
- Spano, M. B. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertility and Sterility*, 43-50.
- Stanic, P. M. (2002). Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Cryopreservation of Human Semen*, 65-70.
- Sun J. G., J. A. (1999). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 2-7.
- Thiele, J.J., Friesleben, H.J., Fuchs, J. & Ochsendorf, F.R. (1995) Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Human Reproduction*, 10, 110-115.
- Tomlinson, M.J., White, A., Barratt, C.L., Bolton, A.E. and Cooke, I.D. (1992) The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes. *Human Reproduction*, 7, 517-522.
- Tomsu, M., Sharma, V. & Miller, D. (2002). Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Human Reproduction*, 17, 1856–62.
- Tremellen, K., (2008). Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reproduction*, 14, 243–58.
- Ward, W.S. & Coffey, D.S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of reproduction*, 74-69.
- Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y. & Critser, J.K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48, 146-56.
- OMS, (2010). Examination and processing of human semen. Quinta edición. *WHO Library Cataloguing*.

Zalata, A., Hafez, T. & Comhaire, F. (1995) Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Human Reproduction*, 10, 1444-1451.

<http://www.reproduccionasistida.org/>

<http://www.fertygen.com/>

<http://www.infert.com.br/pagina/16/icsi-convencional>

## 12. ANEXOS

### Medio TALP

	Concentración
NaCl	114.0mM
KCl	3.2mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.0mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.4mM
Na-Lactato	10.0mM
Na-Piruvato	0.5mM
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.0mM
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.5mM
Estreptomicina	mg/ml
Penicilina	mg/ml

Osmolaridad 305± 3mOsm

pH = 7.4

Buffer de lisis prueba cometa

	Concentración
NaCl	2.5M
EDTA	100mM
Tris HCl	100mM
DMSO	10%
DTT	10mM
Tritón	1%
pH= 10	

Buffer de fosfatos AO

	Concentración
Ácido cítrico	0.1M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2M
EDTA	1mM
NaCl	0.15M
pH =6.	

## Crioprotector a base de yema de huevo

	Concentración
Yema de huevo	12%
Glucosa	5.5%
Etilenglicol	3,5%
Estreptomicina	4mg/ml