



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Estudio de la fragmentación de ADN en muestras
criopreservadas de espermatozoides y nucleones
humanos.**

Tesis para obtener el título de

BIOLOGO

PRESENTA:

LINDA VALERIA CASTILLO VIVEROS

TUTOR: M. en C. JUAN CARLOS FLORES ALONSO

FEBRERO 2014



Esta investigación fue realizada con apoyo del Consejo de Ciencia
y Tecnología del Estado de Puebla.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, porque sin ti nada de esto sería posible. Gracias por tu amor, por tu comprensión, por ser la mejor amiga, por el apoyo incondicional que siempre me das No hay palabras para agradecerte y reconocerte este NUESTRO pequeño gran logro. TE AMO

A Jorge, por estar siempre conmigo en las buenas en las malas y en las peores, por ser Mí persona TE AMO

A mi familia, ustedes queridos abuelitos, tíos y primos, porque siempre he contado con su apoyo y me han incentivado a seguir adelante, a lo largo de toda mi vida.

A mi director de tesis, M. en C. Juan Carlos Flores Alonso por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado que culminara uno de mis objetivos

A la Dra. Lili por su constante y paciente seguimiento y asistencia compartiendo su tiempo y conocimiento de manera generosa durante el desarrollo del presente trabajo.

A mis sinodales: Dra. Rosalina Reyes Luna y al M en C. Ubaldo Quiroz López por sus valiosas sugerencias, amabilidad e interés Gracias por todo su tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

También me gustaría agradecer a mis profesores que durante toda mi carrera profesional han aportado a mi formación profesional, valoro mucho su trabajo y esfuerzo. Un agradecimiento especial al Dr. José Antonio Rivera Tapia por su invaluable apoyo y confianza.

A Diana, Lalo y Mau por la ayuda con el procesamiento de las muestras y por hacer la estancia en el laboratorio más agradable y divertida.

Gracias también a mis queridos amiguitos, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos años de convivencia, los quiero.

A todas las personas que han sido parte de mi vida.

DEDICATORIA

*Con todo mi amor
A las razones de la razón de mi existencia.*

*Doris,
Julia, Hermelinda,
Francisco y Pablo*

ÍNDICE

1. Introducción	11
1.1 Infertilidad	11
1.2 Infertilidad masculina	11
1.3 Integridad del ADN espermático	10
1.4 Factores que propician la fragmentación de ADN espermático	15
1.5 Metodologías para analizar la integridad del ADN espermático	17
1.6 Técnicas de reproducción asistida	18
1.6.1 Nucleones.....	19
1.6.2 Criopreservación.....	20
2. Antecedentes	22
3. Justificación	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	26
6. Material y métodos.....	27
6.1 Obtención de la muestra	27
6.2 Diseño y plan experimental	27
6.3 Análisis seminal	28
6.4 Procesamiento de las muestras de semen	30
6.4.1 Criopreservación de las muestras	31
6.5 Obtención de nucleones humanos.....	31
6.6 Actividad Metabólica	32
6.7 Determinación de la fragmentación de ADN en espermatozoides y nucleones humanos	32
6.7.1 Tinción con anaranjado de acridina	32
6.7.2 Prueba cometa	33
6.7.3 Citometría de flujo.....	34
6.8 Análisis Estadístico	35
7. Resultados	37
7.1 Evaluación macroscópica y microscopia del eyaculado.....	37

7.2 Nucleones	39
7.3 Prueba de actividad metabólica por reducción de resazurin.....	39
7.4 Comparación de la fragmentación de ADN entre el grupo de muestras frescas.....	42
7.5 Comparación de la fragmentación de ADN entre el grupo de muestras criopreservadas.....	45
8. Discusión	51
9. Conclusión	59
10. Perspectivas	61
11. Bibliografía	62
12. Anexos	68

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELO ROSQUILLA-BUCLE DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA.....	13
FIGURA 2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO..	14
FIGURA 3. HEMOCITOMETRO DE NEUBAUER.	30
FIGURA 4. DISEÑOS ESQUEMÁTICOS DE ALGUNAS FORMAS ATÍPICAS DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.....	30
FIGURA 5. PRUEBA COMETA ESPERMATOZOIDES CON ADN NO FRAGMENTADO Y FRAGMENTADO.	34
FIGURA 6. CITOGRAMA MOSTRANDO FLUORESCENCIA VERDE (ADN INTEGRO) VERSUS FLUORESCENCIA ROJA (ADN FRAGMENTADO).....	36
FIGURA 7. ESPERMATOZOIDES EN CONTRASTE DE FASE EN DIFERENTES ESTADIOS.	39
FIGURA 8. ACTIVIDAD METABÓLICA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS DEL GRUPO DE MUESTRAS FRESCAS.	40
FIGURA 9. ACTIVIDAD METABÓLICA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS CRIOPRESERVADOR POR CINCO AÑOS.	41
FIGURA 10. PRUEBA COMETA Y PRUEBA CON ANARANJADO DE ACRIDINA DEL GRUPO DE MUESTRAS FRESCAS.	43
FIGURA 11. CITOGRAMAS MOSTRANDO FLUORESCENCIA VERDE VERSUS FLUORESCENCIA ROJA (ADN FRAGMENTADO).	46
FIGURA 12. CITOGRAMAS MOSTRANDO FLUORESCENCIA VERDE VERSUS FLUORESCENCIA ROJA (ADN FRAGMENTADO).	48

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. CONCENTRACIÓN Y VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES FRESCOS Y CRIOPRESERVADOS SIN Y CON CRIOPROTECTOR.	38
GRÁFICO 2. ACTIVIDAD METABÓLICA POR REDUCCIÓN DE RESAZURIN DEL GRUPO DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DE MUESTRAS FRESCAS.	40
GRÁFICO 3. CORRELACIÓN ENTRE LOS ESPERMATOZOIDES METABÓLICAMENTE ACTIVOS Y LA PRUEBA CON TINCIÓN DE AO	42
GRÁFICO 4. PORCENTAJE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN OBTENIDO POR PRUEBA COMETA Y PRUEBA AO DEL GRUPO DE MUESTRAS FRESCAS.	44
GRÁFICO 5. PORCENTAJE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN DEL GRUPO DE MUESTRAS CRIOPRESERVADAS.	49

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. DISEÑO EXPERIMENTAL DE PARCELAS DIVIDIDAS.....	28
TABLA 2. VALORES DE REFERENCIA OMS 2010	29
TABLA 3. VALORES DEL LÍMITE DE REFERENCIA INFERIOR PARA VOLUMEN, CONCENTRACIÓN MORFOLOGÍA, MOTILIDAD Y VIABILIDAD DEL SEMEN HUMANO.	37
TABLA 4. VALORES DE CONCENTRACIÓN, MOVILIDAD Y VIABILIDAD.....	38
TABLA 5. CORRELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD METABÓLICA Y PARÁMETROS ESPERMÁTICOS DE MUESTRAS FRESCAS.	41
TABLA 6. MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS VALORES DE FRAGMENTACIÓN CON LAS PRUEBAS AO Y COMETA, DEL GRUPO DE MUESTRAS FRESCAS.....	44
TABLA 7. MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS VALORES DE FRAGMENTACIÓN CON LAS PRUEBA AO DEL GRUPO DE MUESTRAS CRIOPRESERVADAS.	45
TABLA 8. MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS VALORES DE FRAGMENTACIÓN CON LAS PRUEBA COMETA DEL GRUPO DE MUESTRAS CRIOPRESERVADAS.....	46
TABLA 9. MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR DEL PORCENTAJE DEL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN CON LAS PRUEBA DE CITOMETRÍA DE FLUJO.	47
TABLA 10. MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR DEL PORCENTAJE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN CON LAS PRUEBA DE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	47

RESUMEN

Muchas condiciones de infertilidad que afectan al factor masculino son conocidas y corresponden a alteraciones en la calidad del espermatozoide. La integridad de la cromatina ha sido de vital importancia para la fertilidad masculina. Por lo tanto, los estudios de la integridad del ADN son de suma importancia en la evaluación de todos los varones infértiles previos a una técnica de reproducción asistida y aún más importante es establecer técnicas rápidas y de fácil acceso para la evaluación de dicho parámetro. Para evaluar la integridad de la cromatina y compararla mediante la prueba cometa, técnica con anaranjado de acridina (AOT) la técnica citometría de flujo basada en el ensayo de la estructura de la cromatina en espermatozoides (SCSA), fueron evaluados nueve muestras de semen las cuales fueron sometidas a criopreservación con y sin crioprotector por un mes. Además, alícuotas fueron sometidas a un tratamiento para eliminar el flagelo y las membranas plasmática y nuclear; al mismo tiempos se evaluaron muestras criopreservadas por cinco años con y sin crioprotector. A todos los tratamientos también fue evaluada la actividad metabólica con resazurin. La concentración, motilidad y viabilidad se redujeron significativamente después de ser sometidas a un periodo de criopreservación ($p < 0.001$). El tratamiento que presentó mayor actividad metabólica fue el de núcleos aislados (93.63 ± 8.09) siendo significativamente diferente ($p < 0.05$) al grupo de espermatozoides frescos ($53.73 \pm 18.63\%$). En el grupo de muestras frescas la AOT mostró los porcentajes de fragmentación más bajos siendo diferente con la prueba cometa ($p < 0.01$) y el porcentaje de fragmentación de ADN obtenido por citometría de flujo ($p = 0.02$). Los resultados de la prueba cometa y el porcentaje de DFI no fueron diferentes significativamente. Las técnicas de evaluación espermática analizadas en el presente trabajo son de gran valor predictivo del daño del ADN, ya que a pesar de ser metodológicamente diversas, no existen diferencias al comparar la prueba cometa y el %DFI, siendo la primera una técnica sencilla y de bajo costo que puede ser implementada en análisis previos a someterse a un tratamiento de reproducción asistida.

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 sí después de dos años de mantener relaciones sexuales regulares, sin el uso de algún método anticonceptivo, la mujer no llega a estar embarazada (Mascarenhas, et al., 2012). Este problema afecta 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

Muchas condiciones de infertilidad que afectan al factor masculino son conocidas y corresponden a alteraciones en la calidad del espermatozoide. Estas incluyen varicocele, infecciones genitales, traumas, cirugías, disfunciones genéticas y sustancias tóxicas (Brugo-Olmedo, et al., 2001).

En el 40% de los casos, el origen que causa la infertilidad masculina es desconocido (Massart, et al., 2012). Se estima que cerca del 20% de los casos de infertilidad idiopática tienen altos niveles de fragmentación espermática de ADN, un factor negativo para la fertilidad (Shamsi, et al., 2008). Por lo tanto dicha evidencia ha mostrado que la fragmentación espermática de ADN puede diferenciar a hombres fértiles de infértiles (González-Marín, et al., 2012).

1.3 Integridad del ADN espermático

Durante la espermatogénesis, las espermatogonias sufren un proceso de cambios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos, altamente sofisticados que involucran la transmisión del patrimonio genético; que incluye reducir a la mitad la ploidía, el empaquetamiento de la cromatina y el desarrollo de las espermátides (Chocu, et al., 2012). Todas estas modificaciones dependen de procesos regulatorios de hormonas intratesticulares y extratesticulares (eje hipófisis-hipotálamo-gónada), que a través de vías paracrinas, autocrinas, yuxtacrinas y

endocrinas, contribuyen a la regulación del proceso. Además intervienen funciones de la microvasculatura intertubular, componentes del espacio intertubular y las células de Leyding y Sertoli. El arreglo de los elementos estructurales, los factores químicos que modulan la actividad de las células somáticas y germinales es tal, que la red que une dichas actividades celulares durante la espermatogénesis es bastante compleja. (Holstein, et al., 2003).

La espermatogénesis en mamíferos se subdivide en espermatogoniogénesis, espermiogénesis y espermiación (Chocu, et al., 2012). Es en la espermiogénesis donde 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). Durante la mitad de la espermiogénesis, el tamaño, la forma y la compactación del estado de la cromatina, cambia dramáticamente. La compactación de cromatina permanece como la estructura de una célula somática hasta la última división meiótica, es decir, las espermatídes consisten en un complejo histona-ADN, como en una clásica partícula de nucleosoma (D'Occhio, et al., 2007).

La organización nucleosomal de la cromatina encontrada en espermatídes prematuras desaparece y es remplazado por fibras compactas. La agregación de estas fibras es en gran parte el resultado de la interacción de ADN espermático con protaminas (D'Occhio, et al., 2007). Aunque se ha reportado que aproximadamente el 15% del ADN humano permanece con histonas, que incluyen H2A, H2B y variantes de la H3 (Knobil & Neill, 2006).

Las protaminas son proteínas ricas en cisteína y arginina. Existen dos tipos de protaminas (P1 y P2) involucradas en el empaquetamiento de la mayoría de las especies, aunque en algunas como el bovino y el porcino solo expresan una, la P1. Por lo tanto, la cromatina en los espermatozoides está organizada de una manera notablemente diferente a la de las células somáticas (Miller, et al., 2010).

El empaquetamiento es dirigido por un elaborado proceso durante la fase post-meiótica de la espermatogénesis, donde los nucleosomas son desestabilizados, posiblemente por una hiperacetilación y ubiquitinación masiva de

histonas, disminuyendo dramáticamente la afinidad de las partículas del núcleo de histonas al ADN mediante la reducción de diferencia de carga entre ellos (Miller, et al., 2010). Dado que la organización nucleosomal de la cromatina desaparece y es remplazada por fibras lisas, la agregación de dichas fibrillas da lugar a fibras más grandes que se fusionan en una masa densa homogénea. Simultáneamente, las histonas son remplazadas por proteínas transitorias y después por protaminas, que son las responsables de la condensación final y la estabilidad de la cromatina espermática (D'Occhio, et al., 2007; Miller, et al., 2010).

Existen tres eventos importantes durante el paso a proteínas transitorias: 1) transformación de la cromatina tipo nucleosomal en una fibra de cromatina suave, 2) inicio de la condensación de la cromatina y 3) la suspensión de la transcripción (D'Occhio, et al., 2007).

Las protaminas se unen al ADN de una manera longitudinal a lo largo del surco mayor de la doble hélice, doblando el ADN en espirales que forman una estructura de rosquilla llamada estructura toroidal. Cada estructura tipo rosquilla está unida a la matriz nuclear (MAR, ver Fig.1).

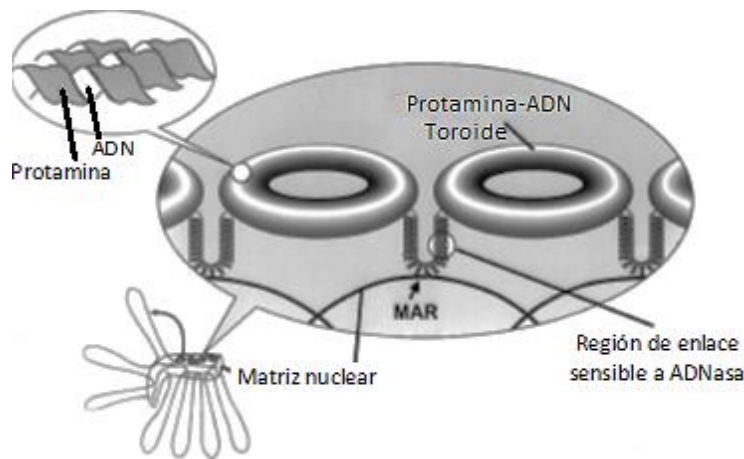


Figura 1. Modelo rosquilla-bucle de la estructura de la cromatina espermática. ADN espermático está formado por 50 kb en forma toroidal alrededor de protaminas (Sotolongo, et al., 2003).

Los círculos concéntricos formados por el complejo protamina-ADN se contraen en una estructura toroidal y están altamente compactados por fuerzas de Van der Waal's. La estabilidad de la cromatina está determinada por el número de puentes disulfuro formados entre las cadenas de protaminas. La eficiencia de la

formación de los puentes disulfuro intermoleculares depende de la posición y unión óptima de las protaminas (D'Occhio, et al., 2007).

La estabilización de la cromatina del espermatozoide empieza en el testículo y continúa durante el paso a través del epidídimo (Miller, et al., 2010).

La espermatogénesis termina cuando las células son liberadas del epitelio germinal. Esta última fase es llamada espermiación. En este punto, las células libres son llamadas espermatozoides (Fig. 2.), células altamente diferenciadas en estructura y función, y capaces de fusionarse con un ovulo para comenzar el proceso que dará lugar a una próxima generación (Holstein, et al., 2003).

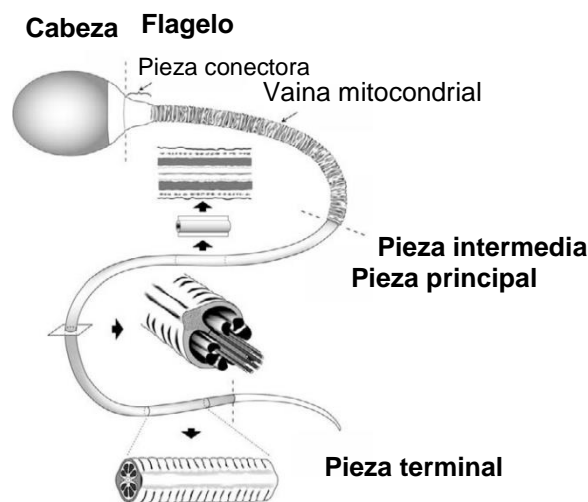


Figura 2. Características generales del espermatozoide humano. La cabeza del espermatozoides está unida al flagelo atreves de la pieza intermedia. Las regiones del flagelo son la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal. La pieza intermedia contiene la vaina mitocondrial, mientras la pieza principal contiene vaina fibrosa. Vistas longitudinales y transversales de la pieza principal y un segmento de la vaina fibrosa se indican mediante flechas (Knobil & Neill, 2006).

A pesar que la espermatogénesis es un proceso largo, no es eficiente en términos de calidad, ya que del 100% de células destinadas para ser espermatozoides potencialmente viables en la reproducción, sólo lo es el 12% (Holstein, et al., 2003). Además, pueden existir problemas durante la espermatogénesis, los cuales se reflejan en una producción baja o ausente de espermatozoides y dichos problemas son descritos en un análisis de semen como, azoospermia (ausencia del eyaculado), oligozoospermia (concentración/ml de

espermatozoides por debajo de los valores mínimos de referencia), teratozoospermia (porcentajes de espermatozoides morfológicamente normales por debajo de los valores mínimos de referencia), astenozoospermia (porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva por debajo de los valores mínimos de referencia), o una combinación de los últimos tres oligoastenoteratozoospermia. Por lo que el factor masculino es responsable aproximadamente del 50% de los casos de infertilidad en las parejas (Massart, et al., 2012).

1.4 Factores que propician la fragmentación del ADN espermático

La integridad del ADN espermático se define como la ausencia de mellas, cadenas rotas sean sencilla o dobles y de modificaciones químicas al ADN (Shamsi, et al., 2008; Muratori, et al., 2008).

Diversos estudios han mostrado que la fragmentación del ADN no impide la fertilización, de hecho, el ovocito tiene la maquinaria para poder hacer reparaciones cuando es fertilizado por espermatozoides que presentan pequeños daños en el ADN. Sin embargo, sí la fertilización de un ovocito ocurre con un espermatozoide con una fragmentación a lo largo de la doble hélice del ADN, puede ser no reparable e incompatible con el desarrollo normal del feto ocasionando fallas en la implantación, muerte gestacional o abortos (González-Marín, et al., 2012).

Las causas de fragmentación de ADN espermático pueden ser intrínsecas o extrínsecas. Entre las causas intrínsecas están el entrecruzamiento entre la cromatina y el ADN, también puede ser inducida por ataques oxidativos, por ejemplo: radicales hidroxilo y radiación ionizante. La formación de radicales hidroxilo puede resultar en la inducción indirecta de daño a las dobles cadenas de ADN espermático a través de la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas. A pesar de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un importante y positivo papel modulando la proliferación celular, también tienen efectos negativos ya que pueden dañar cualquier estructura celular incluyendo el ADN (González-Marín, et al., 2012).

Otras formas por la cual el ADN puede estar fragmentado son por defectos en el cambio de histonas a protaminas por actividad de nucleasas endógenas y por tasas anormales de protaminas P1 y P2 (Evenson & Wixon, 2006).

La fragmentación de la doble hélice del ADN también puede ser ocasionada por la activación de vías apoptóticas que se induce durante la maduración de espermatozoide (D'Occhio, et al., 2007).

Otro de los factores que ha tenido relevancia en los problemas de infertilidad masculina y que se ha incrementado de manera importante en la población mexicana es la obesidad. Diversos estudios muestran que la obesidad puede afectar la fertilidad a través de diferentes mecanismos los cuales pueden inducir disfunción eréctil y/o daños en la calidad del espermatozoide. Entre las causales de infertilidad podemos encontrar: 1) mal funcionamiento del eje Hipotálamo – Hipófisis -Testículo (HHT): el perfil hormonal de personas obesas está caracterizado por la reducción en las concentraciones de testosterona, gonadotropinas, globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) y/o inhibina B (marcador de la funcionalidad de las células de Sertoli) e hiperestrogenemia (consecuencia de la sobre activación de la aromatasa por incremento del tejido adiposo); 2) incremento en la liberación de las hormonas del tejido adiposo: el incremento de leptina puede ser responsable de algunas alteraciones en el eje HHT y puede también ejercer directamente un efecto deletéreo sobre la fisiología de las células de Leydig, la espermatogénesis y la función espermática; 3) aumento en las adipocinas pro inflamatorias, la alta temperatura escrotal (debido a la acumulación de grasa en las áreas que rodean al testículo), y la acumulación de interruptores endógenos en los adipocitos son los responsables de incrementar el estrés oxidativo en el testículo; 4) la apnea durante el sueño, frecuente en pacientes obesos, suprime el surgimiento nocturno de testosterona necesario para la espermatogénesis (González-Marín, et al., 2012; Martini , et al., 2012; Henkel, et al., 2003).

Las causas extrínsecas son, el tiempo que transcurre entre el análisis y la recolección de la muestra, el método de colección de la muestra, la temperatura de criopreservación; debido a la reacción de procedimientos clínicos como

radioterapia o quimioterapia, tratamientos médicos, exposición a contaminantes químicos, la edad, el tiempo de abstinencia, tabaquismo, alcoholismo, consumo de alimentos con conservadores, contaminación ambiental, estrés, infecciones genitourinarias por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma*, tratamiento de los espermatozoides con detergentes para el uso en técnicas de reproducción asistida (Howards, 1995; Szczygieland & Steven, 2002; González-Marín, et al., 2012).

1.5 Metodologías para analizar la integridad del ADN espermático

La fragmentación de ADN está ganando interés como una causa potencial de infertilidad, y existen diferentes técnicas disponibles para analizar la estructura de la cromatina y la integridad del ADN. Sin embargo la técnica más apropiada para cuantificar la cantidad de ADN anormal y así poder relacionarlo con la fertilidad, siempre ha estado cambiando, ya que los resultados de las diversas pruebas muchas veces varían entre sí.

Entre los métodos que emplean microscopia se encuentran: la prueba de electroforesis de célula única (prueba cometa), *Adición de nucleótidos dUDP marcados con transferasa desoxinucleótido terminal* (TUNEL), el ensayo *in situ nick traslation* (ISNT), la prueba de *dispersión de la cromatina del semen* (SDS) y la prueba con *anaranjado de acridina* (AOT). Otras técnicas emplean citometría de flujo como la prueba de la *estructura de la cromatina espermática* (SCSA) (D'Occhio, et al., 2007).

La prueba cometa es una técnica muy sensible, debido que mide la respuesta de células individuales. El método está basado en el principio de la migración rápida de pequeños fragmentos de ADN hacia el ánodo en una cámara de electroforesis comparado con los fragmentos de ADN no dañado, por lo consiguiente, el ADN integro permanece en la cabeza del espermatozoide y el dañado migra para formar la forma de un cometa. Gracias al pH alcalino (pH>10) se puede identificar roturas de una o dos hebras (Evenson & Wixon, 2006).

La esencia del ensayo de túnel es la transferencia de nucleótidos marcados de manera fluorescente al grupo 3'OH de ADN dañado con el uso de la transferasa deoxynucleotidyl terminal. Bajo microscopia de fluorescencia los

espermatozoides con ADN dañado emiten fluorescencia. Una modificación de esta prueba es la ISNT, en la cual se incorporan –dUTP biotinilado a las hebras sencilla en una reacción catalizada por el templado dependiente de la ADN polimerasa 1; cabe destacar que la prueba TUNEL puede detectar roturas de cadena doble o sencilla (Shamsi, et al., 2008).

SCSA es la técnica en la cual la extensión de ADN desnaturalizado (inducida por tratamientos de calor o ácidos) es determinada por citometría de flujo, midiendo el desplazamiento metacromático del anaranjado de acridina (AO) de fluorescencia verde (AO intercalado en cadena de ácidos nucleicos doble) a fluorescencia roja (AO asociado con hebras sencillas de ADN). El parámetro más importante en esta técnica es el Índice de Fragmentación de ADN (%DFI) (Shamsi, et al., 2008).

La prueba SCD se basa en la pérdida parcial de protaminas de la cromatina, la cual se evalúa por microscopía de fluorescencia, discriminando entre los espermatozoides que producen un halo de dispersión de cromatina en la cabeza y aquellos que no presentan dicho halo, para lo cual se emplean sondas fluorescentes (Restrepo, et al., 2013).

AOT es una prueba simplificada del método SCSA, que no requiere citómetro de flujo y depende de la interpretación visual de los espermatozoides que fluorescen en un rango de colores que va del verde al rojo. Espermatozoides con hebras dobles de ADN fluorescen verde, mientras que aquellos con hebras sencillas de ADN presentan desde una fluorescencia anaranjada hasta roja (Shamsi, et al., 2008).

Es importante hacer notar, que estas técnicas aún no han sido propuestas como pruebas de valoración del ADN espermático debido al alto costo de los reactivos y equipos necesarios y a la falta de resultados concisos (Pérez-Cerezales, et al., 2012).

1.6 Técnicas de reproducción asistida

Debido a las diversas causas que pueden afectar la calidad del espermatozoide, han surgido diversas herramientas de reproducción asistida, las

cuales son un recurso común al que recurren las parejas que enfrentan este tipo de problemas, por lo que ha tendido un gran impacto ayudando a individuos infértiles (Gurmankin, et al., 2005).

Las técnicas más populares en reproducción asistida son la fertilización *in vitro* (IVF) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Sin embargo, existen otras técnicas de reproducción asistida como son la inseminación artificial (AI) y la inseminación intrauterina (IUI) (Ajduk, et al., 2006).

Anormalidades anatómicas y de secreción, así como inmunológicas, constituyen las más importantes indicaciones para una IUI. Esta técnica ha sido usada como tratamiento alternativo para la azoospermia y astenoteratozoospermia (Alves da Motta & Serafini, 2002).

La IVF se utiliza principalmente cuando la IUI ha fallado, por infertilidad masculina y por factores inmunológicos (Alves da Motta & Serafini, 2002; Franco & Baruffi, 2002).

La inyección intracitoplasmática es la inyección microquirúrgica de un sólo espermatozoide dentro de un oocito. Este método se ha convertido en la elección para el tratamiento de diversas causas de infertilidad del factor masculino y para casos en el que el fracaso de la fertilización es inexplicable (Yanagimachi, 2005).

La ICSI se ha empleado para tratar de evitar varias etapas del evento de fertilización (Delgado, et al., 1999). Esta técnica ha permitido realizar experimentos con el núcleo del espermatozoide inyectándolo dentro del oocito, incluso se han utilizado espermatozoides inmovilizados (congelados sin crioprotector o dañado el flagelo) también llamados “asesinados” intencionalmente, todo esto también con el objetivo de hacer más eficiente la ICSI. (Yanagimachi, 2005).

1.6.1 Nucleones

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides humanos en los ovocitos es una técnica compleja que omite muchos de los procesos de selección natural que ocurren durante la fertilización. Diversos estudio muestran que el uso de esta técnica pueden provocar alteraciones en el desarrollo de la progenie (Fernández_González, et al., 2008). Debido a esta situación, una modificación a la

técnica es la microinyección de sólo los núcleos de los espermatozoides, los cuales ya han sido inyectados en el ovocito y se ha logrado obtener ovocitos fertilizados, esto desde 1976 (Yamauchi, et al., 2002).

Por otra parte, se han logrado obtener estructuras de cromatina denominada “nucleones”, que son obtenidas del espermatozoide después de que el flagelo, el acrosoma y las membranas fueron solubilizados. Cabe destacar que los nucleones humanos muestran actividad metabólica a causa del consumo de oxígeno, el cual incrementa los niveles de ATP. Todos estos mecanismos toman lugar sin la participación de las membranas espermáticas (plasmática, acrosomal, nuclear), orgánulos sub celulares o proteínas externas al núcleo espermático aun cuando son mantenidos a temperaturas de -5° y 5° C (Reyes, et al., 2001).

1.6.2 Criopreservación

La técnica de criopreservación de espermatozoides ha sido ampliamente utilizada en técnicas de reproducción asistida. Las principales técnicas como IUI, IVF e ICSI han sido adaptadas para el uso de espermatozoides que sufren un proceso de congelación-descongelación (Boitrelle, et al., 2012).

Sin embargo, durante el proceso de la criopreservación, los efectos osmóticos del congelamiento y descongelamiento pueden disminuir la capacidad fertilizante de la membrana celular y la movilidad espermática, creando alteraciones como enrollamiento del flagelo, daño estructural y funcional al acrosoma y fragmentación del ADN (Ortloff, et al., 2006). Como resultado de lo anterior, las técnicas de congelación, descongelación y los medios diseñados para la criopreservación han sido redefinidos por años, sin llegar a obtener un medio estándar para el proceso, además el rango óptimo de temperatura es controversial (Nallella, et al., 2004).

Se han buscado diferentes alternativas para tratar de eliminar o disminuir el daño provocado por la criopreservación mediante crioprotectores. El glicerol fue el primer crioprotector para espermatozoides, sin embargo, ha mostrado algunos efectos tóxicos (Stanic, et al., 2000). En la actualidad existe una amplia variedad

de crioprotectores entre los más usados están TEST yema, el buffer Tris yema, Sperm Freezing Medium y Enhance Sperm Freeze (Nallella, et al., 2004) .

Toda esta discrepancia que existe acerca de la criopreservación aumenta aún más debido a que existen diferentes métodos de congelación de semen, como congelación en vapor, congelación rápida o vitrificación, congelación lenta o convencional, y la liofilización. En las tres primeras se utiliza nitrógeno líquido como agente congelante (Stanic, et al., 2000).

Una de las principales diferencias entre el método de congelación rápida y lenta es que mientras que en la criopreservación convencional, la concentración del crioprotector es baja y la velocidad de enfriamiento es muy lento para evitar la cristalización del hielo, en la vitrificación el enfriamiento es ultrarrápido, requiere una alta concentración de crioprotector, en donde la solidificación de una solución a baja temperatura no es por cristalización de hielo, sino por la elevación extrema de la viscosidad durante el enfriamiento (Nawroth, et al., 2005).

2. ANTECEDENTES

Actualmente existen datos que indican que cerca del 20% de los casos de fertilidad masculina idiopática, tienen un alto grado de fragmentación espermática (Shamsi, et al., 2008). Diversos estudios han evidenciado lo anterior, ya que al realizar pruebas de fragmentación de ADN espermático, indica que niveles elevados de fragmentación de ADN están positivamente correlacionadas con las tasas más bajas en la fertilización *in vitro* (González-Marín, et al., 2012).

Algunos reportes han mostrado que en pacientes cuyas muestras presentan más del 30% de espermatozoides con fragmentación en el ADN, la gestación natural es nula y los abortos son 1.7 veces más frecuentes (Shamsi, et al., 2008).

Se ha demostrado que las protaminas también son esenciales durante la fertilización y cualquier alteración en los niveles de protaminas puede llevar a daños en el ADN del espermatozoide e impedir la fertilización. (D'Occhio, et al., 2007).

Dentro de las técnicas de reproducción asistida comúnmente es utilizada la criopreservación de espermatozoides, la cual se ha demostrado que causa daños nucleares al espermatozoide. En el estudio realizado por Boitrelle y colaboradores con hombres infértiles, observaron que la criopreservación induce la vacuolización espermática, disminuye el rango de viabilidad e incrementa la proporción de cromatina no condensada, estando los dos últimos parámetros altamente correlacionados (Boitrelle, et al., 2012).

Estudios utilizando Triton X-100 y dithiothreitol, sustancias sugeridas para aumentar el éxito en ICSI, han mostrado inducir una extensa rotura en los cromosomas de los espermatozoides (Szczygieland & Steven, 2002).

En 2003, Henkel y colaboradores investigaron la fragmentación de ADN espermático mediante el ensayo TUNEL, posteriormente realizaron ICSI e IVF y no encontraron una correlación entre la tasa de fertilización y los espermatozoides con ADN fragmentado. Sin embargo, la tasa de embarazos se redujo significativamente en pacientes con espermatozoides positivos a la prueba de TUNEL.

La AOT ha resultado ser una prueba poco confiable ya que no logra

diferenciar la integridad de ADN entre hombres fértiles e infértiles. Tampoco correlaciona el daño al ADN con los parámetros de movilidad, morfología, viabilidad o concentración espermática (Khalili, et al., 2006).

La técnica SCSA ha sido correlacionada con los parámetros de semen convencionales, además de %HDS y tasas bajas de IVF (Virro, et al., 2004)

Se podría pensar que los daños de espermatozoides de hombres infértiles son mayores debido a la condición del paciente. Sin embargo, se han realizado estudios en el que comparan la condensación de la cromatina, morfología e integridad de membrana y todos los parámetros anteriores disminuyen drásticamente después del proceso de congelación-descongelación de la criopreservación (Hammadeh, et al., 1999; Agarwal & Said, 2003).

Reyes y colaboradores en el 2001, demostraron que los nucleones de bovino criopreservados hasta por nueve meses a -5°C no presentan modificaciones morfológicas (área, perímetro, longitud). En cambio, los criopreservados a 5°C muestran una leve disminución en el área total después de 9 meses de almacenamiento. En este estudio señalan que a pesar de que los nucleones no cuentan con ningún tipo de membrana, muestran una actividad metabólica observada por diacetato de fluoresceína.

Los núcleos aislados de espermatozoides no se han inyectado en ovocitos humanos, no obstante, se ha realizado con hámster teniendo resultados favorecedores, ya que mostraron un desarrollo embrional normal (Shoji Kuretake, 1996; Yamauchi, et al., 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

La integridad de la cromatina de los espermatozoides se considera actualmente como un factor importante en la fertilidad masculina (Miller, et al., 2010).

A pesar de que el origen y los mecanismos responsables del daño al ADN espermático aún no se aclaran, se ha propuesto que la fragmentación del ADN espermático es quizás uno de los mejores parámetros para predecir el estado de fertilidad masculina, además de los parámetros estándar utilizados actualmente en las rutinas de análisis de semen. Aunque los pacientes infértiles tengan espermatozoides con morfología normal, esas células germinales pueden poseer un ADN dañado. Esto puede resultar en la pérdida de la gestación o en el nacimiento de una prole con menores o mayores malformaciones congénitas, pudiendo llevar a un incremento en la predisposición de ciertos tipos de cáncer (Agarwal & Said, 2003).

Actualmente, se ha reportado que la fragmentación en el ADN de los espermatozoides no impide la fertilización y la segmentación embrionaria ya que el genoma está transcripcionalmente inactivo hasta dos días después de la fertilización (Agarwal & Said, 2003). Sin embargo, una vez que el genoma se activa, el resultado es un pobre desarrollo del blastocito, segmentaciones irregulares, fallas en la implantación o pérdida temprana del embrión. Las alteraciones pequeñas en el ADN pueden ser reparadas por mecanismos pre y post replicación pero no es así con los daños severos.

Las diversas técnicas que cuantifican el daño al ADN presentan resultados contradictorios en su habilidad para revelar y discriminar el estado del ADN. Sin embargo, cada técnica podría explicar aspectos diferentes del estado de la cromatina espermática.

Por lo tanto, los estudios de la integridad del ADN son de suma importancia en la evaluación de todos los varones infértiles previos a una técnica de reproducción asistida y aún más importante es establecer técnicas rápidas y de fácil acceso para la evaluación de dicho parámetro.

4. HIPÓTESIS

1. La criopreservación de espermatozoides humanos, con y sin crioprotector, puede inducir la fragmentación del ADN espermático, en un mayor número de células cuando fueron preservadas por cinco años, en comparación con las criopreservadas por un mes. Asimismo la integridad del ADN de nucleones será mayor que el presentado por espermatozoides frescos y criopreservados.

2. La prueba COMETA es una técnica más precisa para determinar espermatozoides con ADN fragmentado, en comparación con la microscopia de fluorescencia y la citometría de flujo.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la integridad de la cromatina espermática humana en diferentes tratamientos y tiempo de criopreservación y núcleos aislados; así como probar la habilidad de las tres técnicas para evaluar la compactación e integridad de la cromatina: anaranjado de acridina, cometa y citometría de flujo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la viabilidad celular de espermatozoides humanos obtenidos de muestras frescas y criopreservadas durante cinco años.

Determinar la presencia de actividad metabólica de los espermatozoides y nucleones humanos obtenidos de muestras frescas y criopreservadas durante cinco años.

Evaluar la técnica de prueba cometa y la tinción con anaranjado de acridina como técnicas eficaces, rápidas y de bajo costo para el análisis de fragmentación de ADN espermático.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de la muestra

Eyaculados frescos de semen humano fueron obtenidos de donadores voluntarios sanos, previo consentimiento, con edades entre 20 y 25 años. Las muestras fueron obtenidas por masturbación luego de dos a cuatro días de abstinencia, se permitió la licuefacción a temperatura ambiente por 60 minutos y se analizaron dentro de la hora de recolección de las mismas, manteniéndolas a una temperatura de 37°C. Una vez en el laboratorio se procedió a realizar el análisis de las muestras por espermatobioscopia.

De cada muestra se obtuvieron cuatro alícuotas para los siguientes tratamientos: núcleos aislados o nucleones, muestras criopreservadas con y sin crioprotector.

Las muestras de espermatozoides criopreservadas durante cinco años con el crioprotector medio de preservación para semen humano (HSPM) y sin crioprotector fueron proporcionadas por el laboratorio de Biología de la Reproducción perteneciente al Centro de Investigación Biomédica de Oriente del IMSS.

6.2 Diseño y plan experimental

Se establecieron dos grupos, el primero conformado por cuatro tratamientos los cuales son los siguientes: espermatozoides frescos (EF), espermatozoides criopreservados con crioprotector (ECC) y espermatozoides criopreservados sin crioprotector (ESC), nucleones. El segundo, igualmente formado por cuatro tratamientos: espermatozoides criopreservados con crioprotector, espermatozoides criopreservados sin crioprotector, espermatozoides criopreservados con crioprotector por cinco años (EC5) y espermatozoides criopreservados sin crioprotector por cinco años (ES5). Al primer grupo lo llamaremos grupo de muestras frescas y al segundo grupo de muestras criopreservadas.

En el grupo de muestras frescas se utilizó el diseño de Split Plot (parcelas divididas) y se muestra en la tabla 1, donde el semen (plot mayor), fue expuesto a parámetros seminales, técnica con resazurin y tres técnicas de fragmentación de ADN (sub plot), en función al tratamiento.

Un diseño de bloques fue utilizado para el grupo de muestras criopreservadas, en el cual se evaluaron las mismas técnicas y parámetros que en el grupo anterior.

	Tratamiento		EF	Nucleones	ECC	ESC
	Técnicas					
Eyaculados N=9	Parámetros seminales					
	Resazurin					
	Técnicas de fragmentación	Tinción con anaranjado de acridina				
		Prueba cometa				
	Citometría de flujo					

Tabla 1. Diseño Experimental de Parcelas Divididas del grupo de muestras frescas

6.3 Análisis seminal

Tanto a las muestras frescas como criopreservadas por cinco años se les determinaron los siguientes parámetros seminales: volumen, viabilidad, motilidad, morfología y concentración de espermatozoides, todo lo anterior siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicados en el 2010 (Tabla 2).

Viabilidad: El porcentaje de espermatozoides vivos se determinó utilizando el kit LIVE/DEAD Sperm Viability® (Molecular Probes). Una alícuota de 10µl de semen se mezcló con una alícuota de 1 µl de yoduro de propidio (1:10) y 1 µl del fluorocromo SYBR 14 (1:100 diluido con DMSO) se homogeneizó cuidadosamente por inversión. Luego de 5 minutos se observó por microscopia de epifluorescencia utilizando un objetivo de 40X (Nikon E-600, Japón) y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos (células con fluorescencia verde) y muertos (fluorescencia roja) sobre un total de 200 espermatozoides. Las fluorescencias emitidas por los espermatozoides son debidas a lo siguiente, el fluoróforo SYBR14 es permeable a la membrana por lo que los espermatozoides vivos emiten fluorescencia verde, al

mismo tiempo, la membrana es impermeable a yoduro de propidio, cuya afinidad es a ADN, es por ello que los espermatozoides con una membrana comprometida tienen fluorescencia roja.

Parámetros seminales	Límite inferior de referencia, LRL
Licuefacción	Total a los 60 min
pH	≥7,2
volumen	1,5 ml (1,4-1,7)
Concentración espermática	15 x 10 ⁶ /ml (12-15)
Concentración total	39 x 10 ⁶ (33-46)
Motilidad total (progresivos + no progresivos)	40% (38-42)
Motilidad progresiva	32% (31-34)
Viabilidad	58% (55-63)
Formas normales	4% (3-4)

Tabla 2. Valores de referencia OMS 2010 del límite de referencia inferior (LRI) en espermograma; entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza del 95%

Concentración: La concentración de espermatozoides se determinó utilizando cámara de Neubauer (Fig. 3). Para ello se realizó una dilución de la muestra (dilución idónea según cada muestra) con una solución inmovilizadora (50g NaHCO₃ y 10 ml de formalina 35% en 1000ml de agua destilada) y se colocaron 10 µl de la misma en la cámara. El número de espermatozoides se determinó mediante observación al microscopio de contraste de fase utilizando un objetivo de 40X. Se calculó la concentración de espermatozoides por ml.

Motilidad: Se determinó el porcentaje de espermatozoides con movilidad total (progresivos + no progresivos). Para ello, se colocó una alícuota de semen (10 µl) entre porta y cubreobjetos y se observó al microscopio de contraste de fase utilizando un objetivo de 40X. Se calculó el porcentaje de espermatozoides motiles sobre un total de 200 células evaluadas.

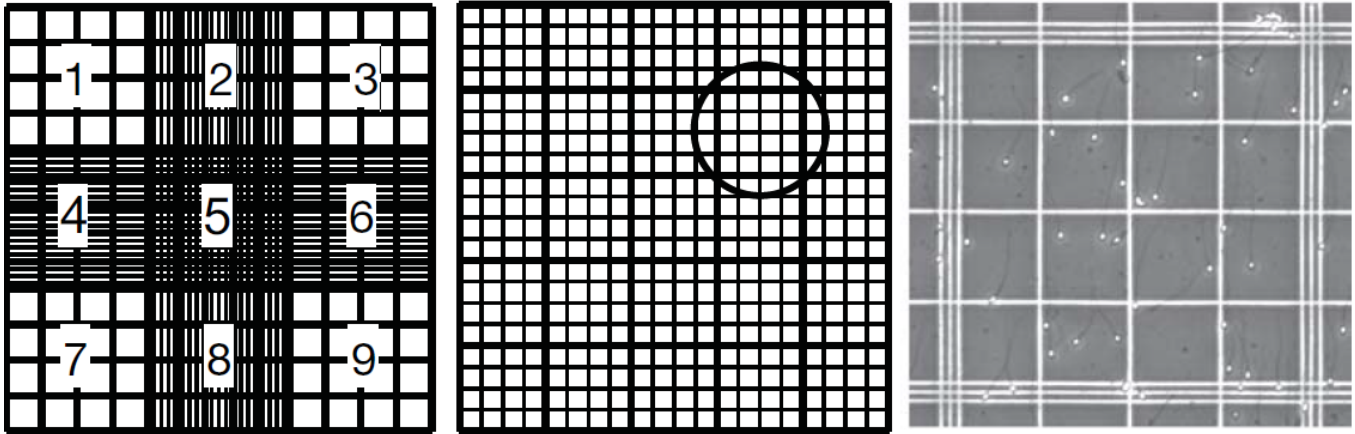


Figura 3. Hemocitómetro de Neubauer. El esquema del área inscrita muestra: las nueve cuadrículas presentes en una cámara del hemocitómetro (recuadro izquierdo), la cuadrícula central (número 5) de 25 cuadros grandes (recuadro central); microfotografía de una parte de la cámara (recuadro derecho).

Morfología: Se determinó el porcentaje de espermatozoides normales y aquellos con defecto de cabeza y pieza intermedia (Fig. 4), sobre un total de 200 células analizadas. Las células se observaron bajo microscopia de contraste de fase utilizando un objetivo de 40 X.

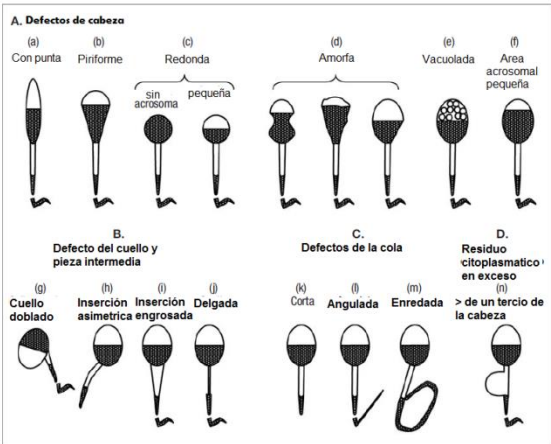


Figura 4. Diseños esquemáticos de algunas formas atípicas de espermatozoides humanos (OMS, 2010).

6.4 Procesamiento de las muestras de semen

Para remover el plasma seminal, las muestras se lavaron por centrifugación a 2500 rpm por 5 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante para ser resuspendidas con solución TALP y se realizó un segundo

lavado siguiendo las condiciones del primero. Enseguida, las células fueron resuspendidas en solución TALP y finalmente se llevaron a una concentración de 100×10^6 espermatozoides/ml.

6.4.1 Criopreservación de las muestras

Para la criopreservación de muestras con crioprotector, se tomó una alícuota de 1 ml de espermatozoides con la concentración de 100×10^6 espermatozoides/ml, fueron centrifugados a 2500 rpm por 5 min para retirar el medio TALP, a continuación se resuspendieron en el medio HSPM. Después de haber sido incubados por una hora a 4°C , se criopreservaron a -20°C por un lapso de tiempo de un mes.

Se tomó 1ml de la solución con la concentración de 100^6 espermatozoides/ml, para obtener las alícuotas criopreservadas sin crioprotector, para ello se incubaron por una hora a 4°C , posteriormente se criopreservaron a -20°C por un mes.

Finalizando el periodo de un mes de criopreservación las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y analizadas con los parámetros siguientes: viabilidad, movilidad y concentración, siempre siguiendo los parámetros establecidos por la OMS 2010.

6.5 Obtención de nucleones humanos

Se utilizaron alícuotas de 0.1 ml de espermatozoides resuspendidos en TALP en una concentración de 100^6 espermatozoides/ml. Las muestras fueron lavadas por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min y fueron resuspendidas en 1ml de TRIS 0.05M y se mezclaron con una solución de DL-Dithiothreitol 9 mM (DTT-Sigma Chemical, Co.) en un amortiguador de Tris 50 mM (pH 8.0). Después fueron incubados a una temperatura de 37°C por un periodo de 10 min. Al finalizar este periodo, se agregó una solución de N-Cetil-N, N, N-Trimetil bromuro de amonio al 1% (CTAB Merck, Co.). La mezcla se incubó nuevamente por 10 min a 37°C . Terminando el periodo de incubación las muestras de espermatozoides se

centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min para separar los nucleones y posteriormente resuspendidas en 1 ml del amortiguador de Tris 50 mM.

Solo los parámetros de actividad metabólica y concentración se analizaron en los núcleos aislados. El primero calculando el porcentaje de estructuras fluorescentes sobre un total de 200 evaluadas y el segundo determinando el número de estructuras mediante observación al microscopio de contraste de fase a 40x de aumento (Nikon E-600, Japón). Se calculó la concentración de nucleones por ml.

6.6 Actividad Metabólica

Para la evaluación de la actividad metabólica de los nucleones y espermatozoides, se empleará una técnica de fluorescencia Resazurin (Molecular Probes, USA), un compuesto diseñado para medir proliferación celular y citotoxicidad de algunos agentes. Este compuesto incorpora un indicador (resazurin) de óxido reducción (REDOX), que flúorese y cambia de color en respuesta a la reducción química del medio (resofurin) como resultado de la actividad metabólica de las células, el cual exhibe absorción y emisión máxima a 575/585 nm. A dos millones de espermatozoides y nucleones se les adicionó 10 μ l del indicador Resazurin (1:100), se incubaron por 30 minutos y posteriormente las muestras se observaron bajo un microscopio confocal (Nikon C1).

6.7 Determinación de la fragmentación de ADN en espermatozoides y nucleones humanos

Con el objeto de estudiar el efecto de la fragmentación del ADN en espermatozoides y nucleones humanos se utilizaron tres pruebas; 1. Tinción con anaranjado de acridina, 2. Prueba cometa 3. Citometría de flujo.

6.7.1 Tinción con anaranjado de acridina

La tinción con anaranjado de acridina (AOT) es un método citoquímico utilizado para la determinación de integridad del ADN. La técnica AOT

espermatozoides con utilizada en este trabajo se basa en la técnica introducida por Tejada (Tejada, et al., 1984).

Para evaluar la fragmentación de ADN de los espermatozoides, alícuotas de 10 μ l de espermatozoides lavados fueron extendidas en portaobjetos y secadas a temperatura ambiente, a continuación se fijaron por 30 min en solución de Carnoy (metanol/ácido acético glacial 3:1); transcurridos los 30 minutos, los portaobjetos fueron lavados con agua destilada y se dejaron secar unos minutos antes de teñir.

La solución de tñido de AO fue preparada al momento, agregando 500 μ l de AO (solución stock 1mg/ml) a 1.5ml de buffer de fosfatos (Ácido cítrico 0.1M, Na₂HPO₄ 0.2M, EDTA 1mM, NaCl 0.15M, pH 6). Todas las soluciones fueron mantenidas en hielo.

Los preparados fueron cubiertos con la solución de AO, mantenidos en oscuridad por 5 minutos y luego enjuagados suavemente con agua destilada hasta que no quedara solución de AO.

Para la tinción de nucleones se tomó una alícuota de 20 μ l y se le agregaron 5 μ l de la solución de tñido y se incubaron por 5 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación se tomaron 5 μ l colocándolos en un portaobjetos.

Los portaobjetos fueron sellados con cubreobjetos y observados bajo un microscopio de confocal (Nikon C1) utilizando un filtro de excitación de 490 nm y un filtro de emisión de barrera de 530 nm. Se evaluó el porcentaje de acuerdo a la fluorescencia de espermatozoides, se cuantificaron al menos 200 espermatozoides de cada condición experimental.

La unión monomérica del AO al ADN de doble hebra, emite fluorescencia verde, mientras que el unido a una simple hebra de ADN flórese de amarillo a rojo (ADN fragmentado).

6.7.2 Prueba cometa

Consiste en colocar 0.02 ml de agarosa punto de fusión normal a una concentración de 0.4% en un portaobjetos. A continuación se colocó un cubreobjetos y se dejó gelificar en refrigeración. Una vez gelificada la agarosa y

de 1×10^6 células/ml. Alícuotas de 0.2 ml de las muestras diluidas fueron mezcladas con 0.4 ml de buffer de desnaturalización acida (Tritón X-100 0.1% (v/v), NaCl 0.15 M, HCl 0.08 M, pH 1.4). Después de 30 segundos, las células fueron teñidas añadiendo 1.2 ml de una solución de AO, que contenía 6 μg de AO por ml de buffer (Ácido cítrico 0.1 M, Na_2HPO_4 0.2 M, EDTA 1 mM, NaCl 0.15 M, pH 6). Todo el procedimiento se mantuvo a 4°C . Después de 3 minutos de haber comenzado el proceso de tinción, la medición de fluorescencia se realizó en un citómetro de flujo (BD Facts Canto II). El citómetro utiliza dos láseres operando a 20 mW y 17 mW, usando una longitud onda 488 nm y 633 nm. Se analizaron 10000 células por muestra.

EL ADN fragmentado fue cuantificado por dos parámetros, el índice de fragmentación de ADN (DFI) este parámetro mide la intensidad de fluorescencia media [DFI=fluorescencias rojas/ (rojas verdes)]. La cromatina sin daños estructurales produce una distribución estrecha, que sería la población principal. El ADN en espermatozoides con daños estructurales en la cromatina, incrementa la fluorescencia roja (Evenson, et al., 1980) que produce una distribución que es usualmente más amplia con un gran número de células fuera de la población principal. La fluorescencia verde refleja el contenido de ADN o el grado de condensación de la cromatina (Fig. 6). El segundo parámetro que se calculó fue el porcentaje de células con fluorescencia verde (ADN sin daños) y fluorescencia rojo (ADN dañado).

6.8 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos serán expresados como el promedio \pm desviación estándar. Los datos no cumplieron con el criterio de normalidad (test Shapiro-Wilks), por lo que fueron transformados (transformación Box-Cox), usando el programa estadístico Minitab.

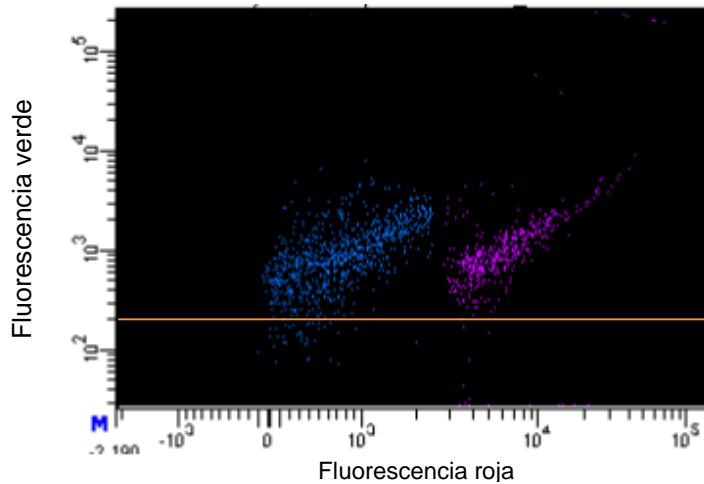


Figura 6. Citograma mostrando fluorescencia verde (ADN integro) versus fluorescencia roja (ADN fragmentado). Los puntos azules representan a la población principal y los puntos morados representan la población fuera de la principal. La línea anaranjada divide al residuo celular.

Tanto en el grupo de muestras frescas como el de muestras criopreservadas se analizaron con la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) seguido por el test de Tukey-Kramer.

La correlación entre los parámetros seminales y la actividad metabólica así como la correlación entre las pruebas de fragmentación, se determinó usando el coeficiente de correlación de Spearman, utilizando el programa estadístico R.

En todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

Para realizar el presente estudio se obtuvieron 22 eyaculados de los cuales sólo se seleccionaron nueve, siguiendo el criterio de mayor concentración de espermatozoides/ml.

El número de muestras criopreservadas por cinco años fue de dieciocho, nueve para el tratamiento de espermatozoides criopreservados con crioprotector y nueve para el tratamiento espermatozoides criopreservados sin crioprotector.

7.1 Evaluación macroscópica y microscopia del eyaculado

La evaluación y características del eyaculado, analizadas en el presente estudio (concentración, volumen, morfología) se encuentran dentro de los parámetros establecidos por el Manual para el Examen del Semen Humano de la Organización Mundial de la Salud publicados en el año 2010; sin embargo el valor de viabilidad espermática disminuyó en comparación al establecido por la OMS (Tabla 3).

El porcentaje de espermatozoides normales varió desde 20 % a 70%. El 33.89 % representó la principal anomalía, la cual fue defecto en la cabeza, seguida por defectos en el flagelo 19.92% y defectos de pieza intermedia 12.76%.

	Volumen ml	Concentración 10 ⁶ esp/ml	Morfología %	Motilidad total %	Viabilidad %
Valores de referencia	1.5	15 x 10 ⁶ /ml	4	40	55
Eyaculados muestras frescas (N=9)	3.04±1.09	175.72±101.06	34.58±17.08	69.83±13.21	52.50±16.92

Tabla 3. Valores del límite de referencia inferior para volumen, concentración morfología, motilidad y viabilidad del semen humano establecidos por la OMS 2010, confrontados con los obtenidos de los 9 eyaculados humanos (Media ± Desviación estándar).

Los valores de concentración, movilidad y viabilidad disminuyeron significativamente, después que los espermatozoides fueron sometidos a

criopreservación. No obstante no existen diferencias significativas entre los espermatozoides criopreservados con y sin crioprotector (Grafico 1).

La disminución de la concentración espermática se debe a que la célula espermática se desintegra, ya que se podían observar flagelos rotos y separados de las cabezas espermáticas.

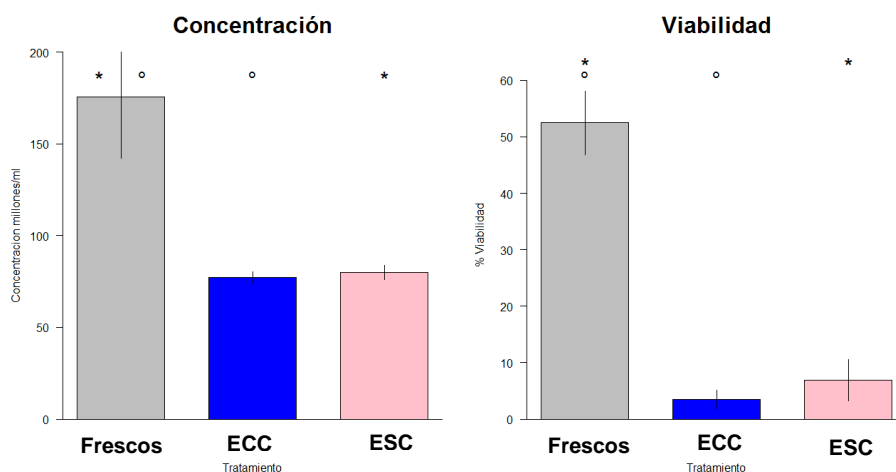


Gráfico 1. Concentración y viabilidad de espermatozoides frescos y criopreservados sin y con crioprotector. Son mostrados los valores de la media \pm el error estándar. Diferentes símbolos * ° indican diferencias significativas entre muestras frescas y criopreservadas $p < 0.001$

La criopreservación a -20°C afecta severamente a los espermatozoides a nivel fisiológico, ya que pierden la totalidad de la movilidad posterior a la criopreservación con o sin crioprotector; y más aún a los espermatozoides de muestras criopreservadas por cinco años, puesto que perdieron completamente la movilidad y los valores de viabilidad eran muy bajos cercanos al 0% (EC5 0.91% y ES5 0.10%, Tabla 4).

Tratamiento	Concentración 10^6esp/ml	Motilidad total %	Viabilidad %
Espermatozoides obtenidos de muestras frescas	175.72 ± 101.06	69.83 ± 13.21	52.49 ± 16.92
Espermatozoides criopreservados con crioprotector un mes	77.19 ± 9.47	0	3.47 ± 5.02
Espermatozoides criopreservados sin crioprotector un mes	79.87 ± 11.27	0	6.89 ± 10.90

Tabla 4. Valores de concentración, movilidad y viabilidad. Datos presentados como la Media \pm Desviación estándar.

7.2 Nucleones

La concentración de espermatozoides para la obtención de nucleones fue de 100×10^6 células por mililitro de TALP, dicha concentración se redujo un 40%, es decir, a 60×10^6 espermatozoides/ml al finalizar el tratamiento con DTT y CTAB (Fig. 7). La diferencia de concentración entre espermatozoides y nucleones fue significativa ($p < 0.05$).

No fue posible evaluar motilidad y viabilidad en los nucleones debido a que son estructuras sin flagelo lo que hace imposible la movilidad, de la misma forma carecen de membrana celular, lo cual, posibilita la entrada de IP al interior de la estructura, tiñendo todas los núcleos aislados de color rojo y ninguno de ellos de color verde.

No se logró medir la fragmentación de ADN por citometría de flujo ya que los nucleones se aglutinaban lo cual impedía el paso por el capilar del citómetro de flujo.

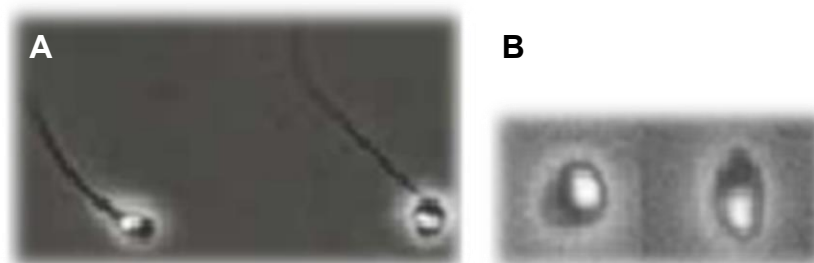


Figura 7. En el panel superior se observan espermatozoides en contraste de fase en diferentes estadios. A Espermatozoides íntegros antes del tratamiento con DTT y CTAB. B Núcleos aislados.

7.3 Prueba de actividad metabólica por reducción de resazurin

La actividad metabólica del grupo de espermatozoides obtenidos de muestras frescas, presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos (Fig.8). Siendo notable que los nucleones presentan mayor actividad metabólica que los espermatozoides frescos, criopreservados con y sin crioprotector ($93.63 \pm 8.09\%$, $53.73 \pm 18.63\%$, $67.46 \pm 25.13\%$ y $83.71 \pm 13.81\%$, respectivamente) (Gráfico 2).

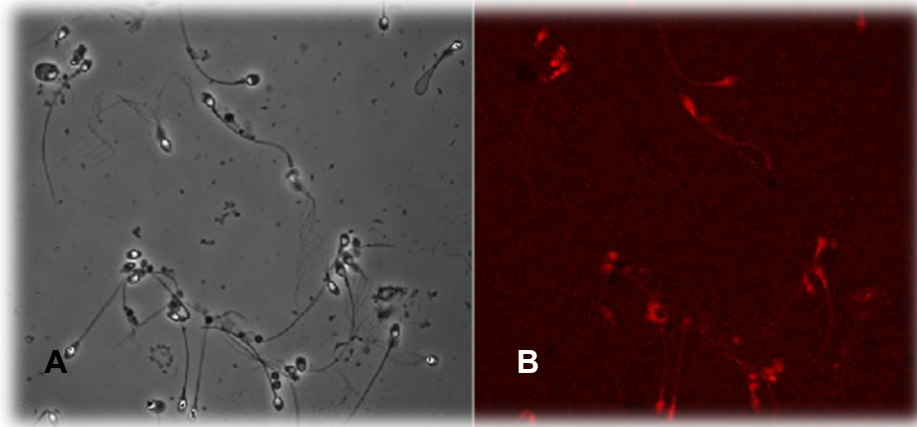


Figura 8. Actividad metabólica de espermatozoides humanos del grupo de muestras frescas. A) Espermatozoides en contraste de fases. B) Espermatozoides siendo excitados a una longitud de onda de 540nm a 600 nm.

En lo que concierne al grupo de espermatozoides criopreservados, ninguno de los cuatro tratamientos (ECC 67.46 ± 25.13 , ESC 83.71 ± 13.81 , EC5 73.37 ± 28.77 , ES5 50.43 ± 45.70) presentó diferencias significativas respecto a la reducción de resazurin.

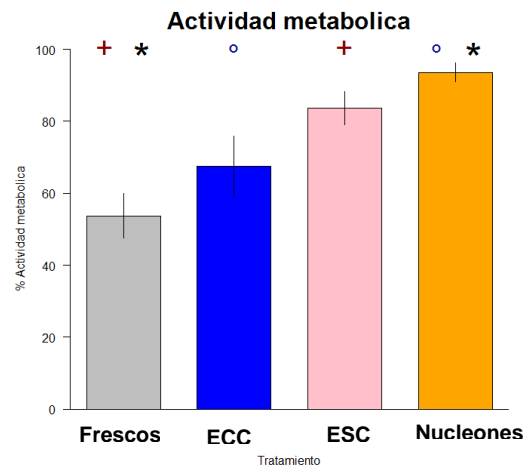


Gráfico 2. Actividad metabólica por reducción de resazurin del grupo de espermatozoides obtenidos de muestras frescas. Son mostrados los valores de la media \pm el error estándar. Los símbolos + * ° representan los tratamientos que difieren significativamente, cada uno con un valor de $p < 0.05$.

Resulta interesante que los espermatozoides criopreservados por cinco años presentan actividad metabólica en un porcentaje cercano a las células que

fueron criopreservadas un mes; incluso el porcentaje de actividad metabólica de las células criopreservadas con crioprotector por cinco años sea más alto que aquellas criopreservadas con crioprotector un mes. Es importante señalar que la intensidad de fluorescencia se redujo en los espermatozoides criopreservados por cinco años, pero aún se producía la fluorescencia del resazurin oxidado al ser excitado a una longitud de onda de 540 a 600nm (Fig. 9).

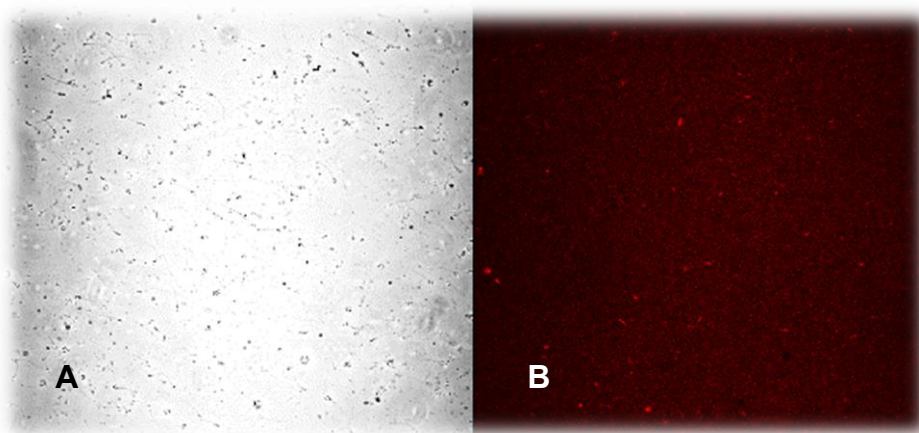


Figura 9. Actividad metabólica de espermatozoides humanos criopreservados por cinco años. A) Espermatozoides en contraste de fases. B) Espermatozoides siendo excitados a una longitud de onda de 540nm a 600nm.

Se realizó un análisis de correlación entre el porcentaje de espermatozoides que fueron metabólicamente activos y el porcentaje de motilidad total, así como un análisis de correlación entre porcentaje de viabilidad y actividad metabólica de muestras frescas, sin embargo ninguno de los dos análisis mostró una correlación entre las variables (Tabla 5).

Parámetros de semen	Actividad metabólica	
	Coefficiente de correlación	P
Concentración espermática	-0.04	0.91
Viabilidad	0.23	0.54
Morfología	0.20	0.58
Movilidad progresiva	-0.11	0.76

Tabla 5. Correlación entre actividad metabólica y parámetros espermáticos de muestras frescas.

De igual manera se realizó un test de correlación entre la presencia de actividad metabólica y las tres diferentes técnicas para evaluar fragmentación de ADN, los resultados muestran que solo la prueba con AO se correlaciona débilmente a la actividad metabólica con un coeficiente de -0.34 y una $p = 0.04$ (Gráfico 3).

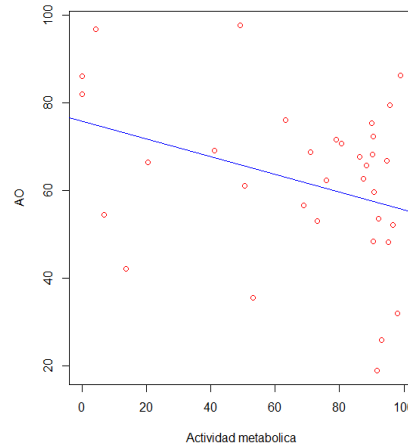


Gráfico 3. Correlación entre los espermatozoides metabólicamente activos y la prueba con tinción de AO

7.4 Comparación de la fragmentación de ADN en el grupo de muestras frescas.

La integridad de ADN de espermatozoides frescos determinada por las pruebas de AO y cometa (Fig. 10), muestra un porcentaje alto de fragmentación 40.27% y 82.96%, respectivamente, valores altos, considerando que las muestras provenían de hombres jóvenes y sanos.

Observando los valores de fragmentación es evidente que el análisis prueba cometa, incrementa el porcentaje de fragmentación, siendo esta diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$).

La diferencia de porcentaje de fragmentación expuesta por las pruebas cometa y AO se repiten con los tratamientos de nucleones y espermatozoides criopreservados sin crioprotector, ambos, teniendo valores estadísticos significativos ($p < 0.05$) y siempre siendo la prueba cometa la que presenta los datos más altos; probablemente por las diferencias en el tiempo de incubación en buffer de lisis.

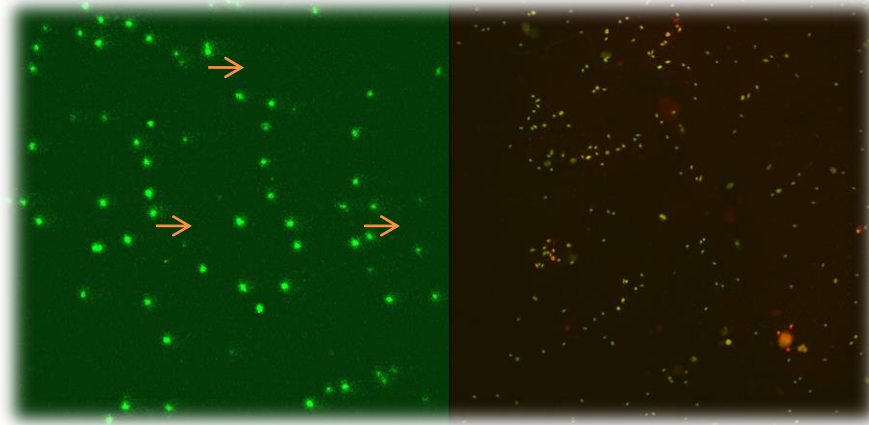


Figura 10. Prueba cometa y prueba con anaranjado de acridina del grupo de muestras frescas. En la imagen derecha se muestran espermatozoides siendo analizados por prueba cometa, en la cual se puede observar la dispersión de ADN mostrado por →. En la imagen izquierda se observan espermatozoides teñidos con AO (verdes ADN íntegro, anaranjado-rojo ADN fragmentado).

A pesar de que el porcentaje de fragmentación de la prueba cometa fue mayor al derivado por AO en el tratamiento restante (espermatozoides criopreservados con crioprotector), no fue significativamente diferente.

Ambas pruebas variaron en el tratamiento que presentó mayor fragmentación de ADN; aunque ambos fueron con tratamientos que se sometieron a criopreservación. Con la prueba AO, el tratamiento que obtuvo porcentajes mayores de fragmentación fue espermatozoides criopreservados sin crioprotector, con una media de 63.59%, a diferencia de la prueba cometa, en la cual los espermatozoides criopreservados sin crioprotector tuvieron el porcentaje de fragmentación más alto (88.45%).

Cabe señalar que el tratamiento de nucleones fue el que presentó el menor porcentaje de fragmentación en las dos técnicas empleadas, AO 31.43% y cometa 66.77%.

En todos los tratamientos siempre se mantuvo la tendencia de aumentar el porcentaje de fragmentación de ADN por parte de la prueba cometa y en la mayoría esta diferencia fue significativamente diferente como se puede observar en la tabla 6.

Tratamiento Prueba	Espermatozoides frescos	Nucleones	Espermatozoides criopreservados con crioprotector un mes	Espermatozoides criopreservados sin crioprotector un mes
Anaranjado de acridina	40.27±12.84***	31.43±15.57**	63.59±7.03	57.045±15.10**
Prueba cometa	82.96±17.21	66.77±20.99	74.48±20.79	88.45±7.96

Tabla 6. Media ± Desviación estándar de los valores de fragmentación con las pruebas AO y cometa, del grupo de muestras frescas. Asteriscos representan diferencias significativas entre pruebas (**p<0.01, ***p<0.001).

Los resultados de fragmentación por la técnica de anaranjado de acridina en el análisis de parcelas divididas mostro diferencias significativas entre la mayoría de tratamientos, excepto en espermatozoides frescos y nucleones (Grafico 4).

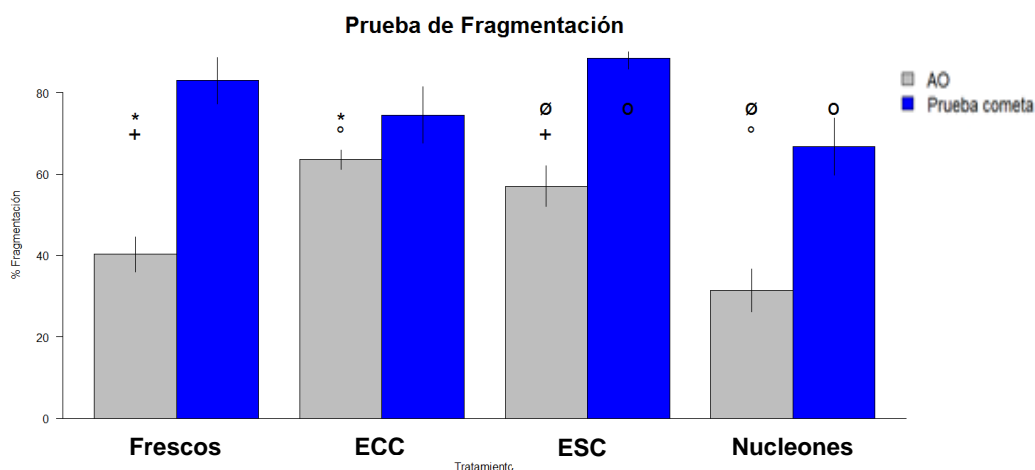


Gráfico 4. Porcentaje de fragmentación de ADN obtenido por prueba cometa y prueba AO del grupo de muestras frescas. Son mostrados los valores de la media ± el error estándar. Diferentes símbolos * (p<0.01), + (p<0.05), ° (p<0.001), ∅ (p=0.001), o (p=0.05) indican diferencias significativas entre tratamientos.

A pesar que el tratamiento de nucleones obtuvo el menor porcentaje de fragmentación, incluso menor que los espermatozoides frescos, no se presenta diferencia estadísticamente significativa. El tratamiento con DTT y CTAB no afecta en el porcentaje de fragmentación de nucleones provenientes de espermatozoides de muestras frescas.

En contraste a lo anterior, los tratamientos de espermatozoides criopreservados con crioprotector y núcleos aislados mostraron una gran diferencia ($p < 0.001$); lo cual implica que la criopreservación provoca daños importantes al ADN del espermatozoide humano.

A diferencia de lo ocurrido con la prueba de AO, con la prueba cometa, solo se presentó diferencias significativas entre los tratamientos de espermatozoides criopreservados sin crioprotector y nucleones ($p = 0.05$) (Gráfico 4).

Lo similar de estas dos pruebas fue que los nucleones son el tratamiento que presenta menor fragmentación de ADN.

7.5 Comparación de la fragmentación de ADN entre el grupo de muestras criopreservadas.

Los espermatozoides obtenidos de muestras criopreservadas fueron analizadas por tres técnicas diversas, tinción con anaranjado de acridina, prueba cometa y prueba con citómetro de flujo.

La prueba de AO revela porcentajes altos de fragmentación de ADN, por arriba del 50% fragmentación en los cuatro grupos, siendo el más alto el del grupo EC5 con 71.47%, seguido por ECC y ESC. Sorprendentemente, el grupo con menor porcentaje de fragmentación es el de ES5. No obstante, los grupos no presentaron diferencias significativas con la prueba de AO (Tabla 7).

	Espermatozoides criopreservados con crioprotector un mes	Espermatozoides criopreservados sin crioprotector un mes	Espermatozoides criopreservados con crioprotector por cinco años	Espermatozoides criopreservados sin crioprotector por cinco años
Porcentaje de fragmentación de ADN	63.59±7.03	57.045±15.10	55.68±28.53	71.47±19.37

Tabla 7. Media ± Desviación estándar de los valores de fragmentación con las prueba AO del grupo de muestras criopreservadas.

Como sucedió con el grupo anterior de muestras frescas, los valores de fragmentación de ADN aumentaron con la prueba cometa, pareciendo ser una prueba más sensible. Otra diferencia con la técnica anterior fue que los EC5, no fue el grupo que presentó mayor fragmentación de ADN, al contrario, fue el grupo

de ESC (88.45%), que en la prueba AO resulto ser el de menor porcentaje de fragmentación y el grupo con menor porcentaje fue EC5 (71.17%) (Tabla 8).

	Espermatozoides criopreservados con crioprotector un mes	Espermatozoides criopreservados sin crioprotector un mes	Espermatozoides criopreservados con crioprotector por cinco años	Espermatozoides criopreservados sin crioprotector por cinco años
Porcentaje de fragmentación de ADN	74.48±20.79	88.45± 7.96	71.17± 26.67	82.55± 10.82

Tabla 8. Media ± Desviación estándar de los valores de fragmentación con la prueba cometa del grupo de muestras criopreservadas.

De la prueba con citometría de flujo se obtuvieron tres diferentes resultados, porcentaje del índice de fragmentación de ADN (DFI), porcentaje de fragmentación de ADN y porcentaje de alta capacidad de tinción del ADN (HDS). Dichos resultados se obtuvieron tras el análisis de las distribuciones de fluorescencia verde y roja (Fig. 11 y 12).

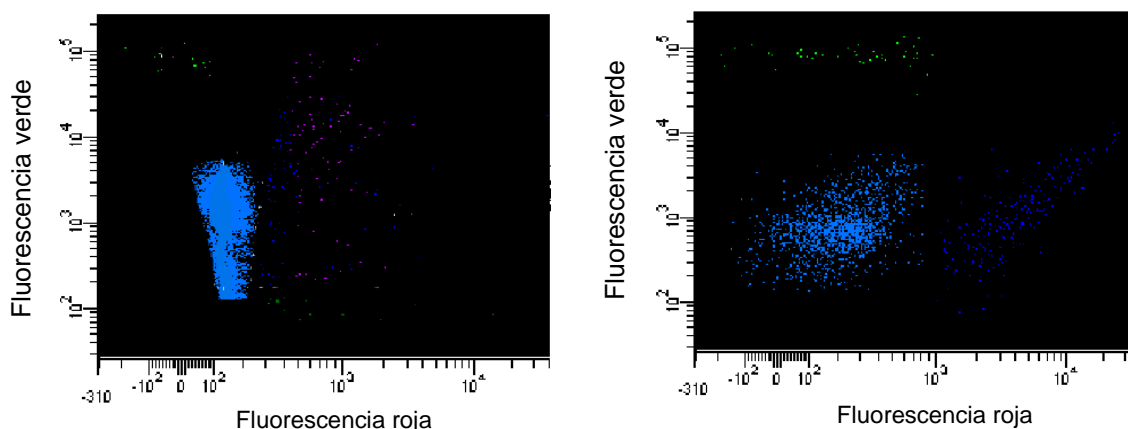


Figura 11. Citogramas mostrando fluorescencia verde versus fluorescencia roja (ADN fragmentado). Izquierda: muestra de semen con un bajo porcentaje de espermatozoides con altos niveles de fragmentación del ADN. Derecha: el semen muestras con altos niveles de fragmentación del ADN. Un total de 10000 eventos fueron medidos y cada punto representa un espermatozoide. Puntos azul claro: población principal, puntos azul oscuro: población ADN fragmentado, puntos verdes HDS, puntos morados: debris.

Respecto al DFI, los porcentajes de fragmentación fueron elevados por arriba del 60% y no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos como

se puede observar en la tabla 9. Analizando los resultados se evidencia que el daño al ADN comienza desde periodos tempranos en la criopreservación a -20°C .

	Espermatozoides criopreservados con crioprotector un mes	Espermatozoides criopreservados sin crioprotector un mes	Espermatozoides criopreservados con crioprotector por cinco años	Espermatozoides criopreservados sin crioprotector por cinco años
Porcentaje de fragmentación de ADN	77.83± 9.75	68.89± 19.62	79.46± 10.62	73.66± 9.33

Tabla 9. Media ± Desviación estándar del porcentaje del Índice de Fragmentación de ADN con las prueba de citometría de flujo.

La tendencia, al no existir diferencias significativas entre tratamientos, se mantuvo en los resultados de porcentaje de fragmentación de ADN. Esta vez los valores de fragmentación no fueron muy altos, siendo el tratamiento de ECC, el que presentó mayor porcentaje de fragmentación (46.08%±12.49%). Los tratamientos restantes, al no ser significativamente diferentes, obtuvieron porcentajes parecidos al tratamiento ECC (Tabla 10).

	Espermatozoides criopreservados con crioprotector un mes	Espermatozoides criopreservados sin crioprotector un mes	Espermatozoides criopreservados con crioprotector por cinco años	Espermatozoides criopreservados sin crioprotector por cinco años
Porcentaje de fragmentación de ADN	46.08± 12.49	33.99± 16.31	38.57± 25.46	42.78± 23.74

Tabla 10. Media ± Desviación estándar del porcentaje de células con fragmentación de ADN con la prueba de citometría de flujo.

La alta capacidad de tinción del ADN fue calculada en base al porcentaje de células espermáticas con altos niveles de fluorescencia verde (Fig. 12). No hubo efectos significativos en los tratamientos y HDS ($p= 0.051$).

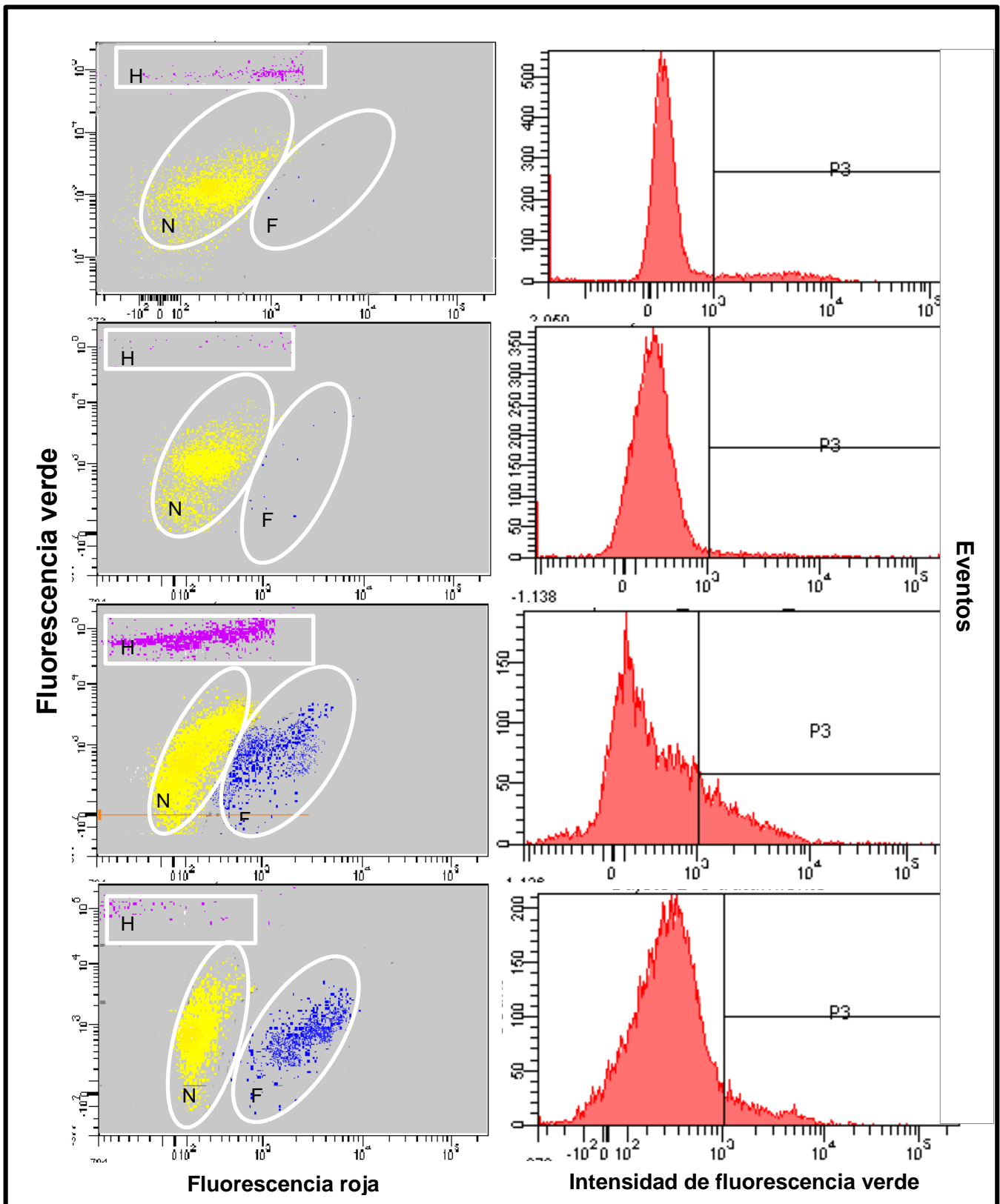


Figura 12. Citogramas mostrando fluorescencia verde versus fluorescencia roja (ADN fragmentado). Las letras representan diferentes tipos de poblaciones H: HDS, N: Espermatozoides con ADN integro, F: Espermatozoides con ADN fragmentado. Histogramas correspondientes a cada citograma representando la intensidad de fluorescencia roja la cual está señalada con el cuadrante P3.

Los valores de las medias de HDS estuvieron por debajo del 15%, porcentaje considerado ser un factor de influencia negativo en el potencial de fertilidad. La media de los porcentajes de HDS fueron los siguientes: EC5 3.13%, ES5 2.04%, ECC 9.44%, ESC 7.03%.

Se observaron diferencias significativas al comparar las técnicas utilizadas en el grupo de muestras criopreservadas (Gráfico 5); resultando ser el porcentaje de fragmentación de ADN obtenido por citometría de flujo diferente al mostrado por la prueba cometa y AO, incluso distinto al porcentaje de DFI datos obtenidos con el mismo método ($p < 0.05$).

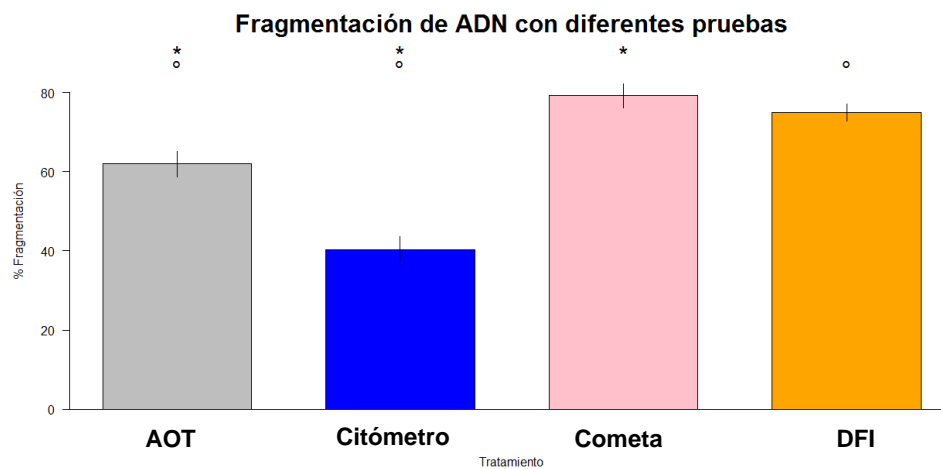


Gráfico 5. Porcentaje de fragmentación de ADN del grupo de muestras criopreservadas, obtenido por las pruebas cometa, AOT y citometría de flujo, de la última prueba obteniendo dos valores DFI y células con ADN fragmentado. Son mostrados los valores de la media \pm el error estándar. Diferentes símbolos *, ° indican diferencias significativas entre pruebas.

Las medias de la tinción con anaranjado de acridina ($61.95\% \pm 19.38\%$) fue el método que presentó menor diferencia significativa con el porcentaje de DFI ($74.96\% \pm 13.14\%$) ($p = 0.02$). La prueba cometa y el porcentaje de DFI no fueron diferentes significativamente ($p = 0.82$), ambas pruebas con porcentajes de fragmentación elevados.

En relación a lo anterior, podría decirse que la prueba de citometría de flujo es comparable con un procedimiento menos costoso, la prueba cometa.

Otra diferencia se encontró entre la prueba de AO y la prueba cometa ($p=0.001$), siendo la media de la prueba cometa ($79.16\% \pm 18.70\%$) mayor a la de tinción con AO ($61.95\% \pm 19.38\%$).

Se llevaron a cabo diversos test de correlación entre las tres pruebas analizadas en este grupo, pero ninguno tuvo algún tipo de correlación. Las pruebas que más se acercaron a tener correspondencia fueron la prueba cometa y la prueba con tinción de AO (coeficiente de correlación 0.30, $p = 0.07$).

8. DISCUSION

En los últimos años, en Latinoamérica así como en el resto del mundo, las consultas por infertilidad han experimentado un incremento notable, incluso la OMS tuvo que reajustar los valores de referencia del espermiograma, disminuyéndolos en comparación a los de la edición de 1999. El análisis seminal continúa siendo la herramienta básica de rutina que brinda la mejor información para evaluar la calidad reproductiva del varón (Sarabia & Munuce, 2011). Sin embargo, en estos análisis no se evalúa la integridad del ADN y la organización de la cromatina espermática, a pesar de que diversos estudios señalan que son factores importantes asociados con la fertilidad (Shamsi, et al., 2008).

En el manual publicado por la OMS para la evaluación del semen no existen parámetros de referencia para la evaluación de la cromatina espermática, a pesar de la existencia de diferentes métodos; posiblemente por la falta de protocolos estandarizados, agregando que las diferentes técnicas desarrolladas para la evaluación de ADN espermático podrían explicar diferentes aspectos del estado de la cromatina (Pérez-Cerezales, et al., 2012).

Dentro de los parámetros que se evalúan, según los criterios de la OMS, está la morfología del espermatozoide. Los resultados aquí presentados muestran que los valores de espermatozoides normales se encuentran dentro del rango establecido por la OMS, a pesar de ser bajos (34%) esto puede relacionarse a los altos porcentajes de fragmentación obtenidos por la prueba cometa y AOT, ya que defectos en la morfología han sido asociados con un aumento de fragmentación del ADN, incremento en la incidencia de alteraciones estructurales de los cromosomas y a cromatina inmadura (OMS, 2010).

Es importante señalar que los valores de fragmentación de ADN en espermatozoides de muestras frescas fue elevado a pesar de que los donadores eran sanos y jóvenes, esto se relaciona con diversos trabajos que indican que el estilo de vida moderno puede inducir a la fragmentación como la exposición a la contaminación del aire, radiación de teléfonos celulares y la nicotina (De Iuliis, et al., 2009; Arabi, 2004; Rubes, et al., 2005). Lo anterior podría explicar los niveles bajos de viabilidad espermática en el presente estudio.

La criopreservación de espermatozoides es una técnica de rutina utilizada en los centros de reproducción asistida. Se ha demostrado que durante el proceso de criopreservación, los efectos osmóticos de la congelación y descongelación disminuyen la capacidad del espermatozoide, por el daño de membranas celulares, disminuyendo severamente la motilidad, creando alteraciones morfológicas y afectando a nivel nuclear al espermatozoide (Nallella, et al., 2004; Davides, et al., 2012). Este estudio revela datos relacionados con lo expuesto anteriormente, ya que la viabilidad celular y la motilidad disminuyó drásticamente después de haber sometido a los espermatozoides a procesos de congelación y descongelación, independientemente del método de criopreservación utilizado.

Se puede observar que el porcentaje de espermatozoides vivos y móviles es prácticamente cero, no existiendo diferencias en el tiempo (un mes o cinco años) o tipo de criopreservación (con o sin crioprotector). Los daños al ADN también aumentaron al comparar los espermatozoides criopreservados por un mes con los espermatozoides frescos. Esto ocurrió debido a que el momento más crítico para las células durante la fase de congelación y descongelación es de los -15°C a -60°C (Nawroth, et al., 2005), temperaturas a las cuales estuvieron sometidos los espermatozoides por largos periodos de tiempo y es en este rango de temperatura donde la formación de cristales de hielo intracelulares o extracelulares se lleva a cabo (Isachenko, et al., 2004).

En los resultados presentados se puede observar que no existen diferencias entre la fragmentación de ADN y el tiempo de criopreservación ya que los daños se ocasionan en el momento de enfriamiento de la criopreservación debido a la deshidratación de la célula (Nawroth, et al., 2005; Boitrelle, et al., 2012). Estudios anteriores señalan que el método de vitrificación no afecta la integridad del ADN (Isachenko, et al., 2004).

La crio supervivencia no solo depende de la temperatura sino también del tipo y concentración de crioprotector utilizado; pero aún no existe el medio el cual prevenga los daños causados por el congelamiento. Reportes previos han comparado la eficiencia de diferentes medios crioprotectores, siendo superior TEST-yolk, seguido de HSPM (Stanic, et al., 2000; Hammadeh, et al., 2001). Un

estudio utilizando el método de vitrificación sin crioprotector muestra que los espermatozoides no mostraron daño en la movilidad y en la integridad del ADN en comparación con espermatozoides frescos, esto no concuerda con los resultados presentados ya que espermatozoides con o sin crioprotector muestran el mismo nivel de daño en el ADN (Isachenko, et al., 2004), la diferencia puede residir en los diferentes métodos de crioprotección utilizados.

Por otra parte, la prueba con resazurin ha sido usada para detectar actividad metabólica gracias al cambio de coloración de azul a rosa por la reducción de resazurin a resofurin. Esta reacción ocurre en células vivas y es atribuida a la reducción de resazurin por diferentes sistemas de enzimas oxidorectasas que utilizan NAD (P) H como un donador primario de electrones (Erikstein, et al., 2010). Los espermatozoides vivos producen factores de reducción como NADH+H durante procesos metabólicos de glicolisis y el ciclo del ácido cítrico, y estos factores participan en las reacciones de óxido-reducción (Zalata, et al., 1998). Por lo expuesto en el párrafo anterior, la prueba con resazurin ha sido propuesta como una alternativa para conocer la viabilidad en espermatozoides humanos y ovinos (Zrimšek, 2011).

En diversos estudios se ha mostrado correlación entre la motilidad, la concentración y la actividad metabólica de espermatozoides de muestras de semen humanas y ovinas (Reddy, et al., 1997; Mahmoud, et al., 1994). Sin embargo, existe una discrepancia entre dicha correlación ya que algunos autores muestran correlaciones positivas entre la concentración de espermatozoides móviles y la reducción de resazurin y otras correlaciones negativas (Zrimsek, et al., 2004; Zrimšek, et al., 2006). Además, se han encontrado correlaciones negativas entre la prueba de resazurin y los altos porcentajes de fertilidad con el uso de semen de bovinos (Foote, 1999).

Los datos aquí presentados no muestran correlación entre la reducción de resazurin y los diferentes parámetros evaluados en el semen humano. Cabe señalar que la correlación aquí presentada se realizó entre movilidad y actividad metabólica (reducción de resazurin) y no con la concentración de espermatozoides móviles. Posiblemente podría presentarse algún tipo de correlación aumentando el

número de la muestra.

Debido a la forma reducida de resazurin, es conocido que acepta electrones de los radicales libres para reaccionar con oxígeno molecular en una manera que promueve la generación de ROS. Además, actúa como un aceptor de electrones en la cadena transportadora de electrones con la membrana interna de la mitocondria y también ha sido relacionada con reacciones de oxidación y reducción en el núcleo y citosol (Erikstein, et al., 2010).

Se conoce que la producción de especies reactivas de oxígeno es un fenómeno común que puede ser una señal de estrés celular que propicia la fragmentación de ADN espermático (Evenson & Wixon, 2006). Esto explicaría porque los espermatozoides criopreservados con crioprotector y sin crioprotector muestran porcentajes más altos de fragmentación que los espermatozoides de muestras frescas. Está bien establecido que la producción de ROS incrementa la peroxidación lipídica después de la criopreservación y este evento está asociado con la pérdida de motilidad en el espermatozoide (Isachenko, et al., 2004). Dicha consecuencia se presentó en los espermatozoides criopreservados ya que perdieron completamente la motilidad.

De igual manera, la peroxidación lipídica está asociada a daños en membranas (Reyes, et al., 2001), y es por ello que la viabilidad en espermatozoides criopreservados fue muy baja. Al existir daño en la membrana espermática, el ioduro de propidio puede penetrar a la célula uniéndose al ADN, otorgándole la fluorescencia roja que presentan los espermatozoides no viables (Escobar, et al., 2009).

El daño causado al espermatozoide por la criopreservación ocurre principalmente durante la descongelación ya que ha sido relacionada con una disminución de la defensa antioxidante durante el enfriamiento, lo que provoca un daño estructural al citoesqueleto durante la criopreservación. Todos estos hallazgos sugieren que el enfriamiento lento, y especialmente descongelación de espermatozoides, además de la formación de cristales de hielo, son intrínsecamente perjudiciales (Isachenko, et al., 2004). Por lo que se propone probar diferentes metodologías de criopreservación y descongelamiento, al

utilizado en el presente estudio, para poder tener información más concisa acerca de la producción de ROS en el espermatozoide y los daños causados en la motilidad.

Sin embargo, la correlación negativa entre actividad metabólica y el porcentaje de fragmentación con AOT, no podría explicarse por este proceso, ya que podría ser atribuido a que los procesos de fragmentación de ADN no se derivan de una sola causa (González-Marín, et al., 2012).

A pesar de que la presencia de resazurin afecta las condiciones de energía y REDOX de la célula, no se han encontrado efectos adversos significativos en la capacidad fertilizante de los espermatozoides bovinos (Wang, et al., 1998).

Se han realizado pocos estudios de actividad metabólica en núcleos aislados de espermatozoides humanos. Reyes y colaboradores, utilizando yoduro de propidio y diacetato de fluoresceína, mostraron que los núcleos aislados de bovinos presentan actividad metabólica por el consumo de oxígeno, el cual incrementa el consumo de ATP, sugiriendo la presencia de síntesis anaerobia de ATP, todo ello sin la participación de las membranas espermáticas u otra proteína externa al núcleo espermático (Reyes, et al., 2001). A pesar de que en este trabajo no fue utilizado yoduro de propidio y diacetato de fluoresceína, en los nucleones se expresaron los niveles más altos de actividad metabólica utilizando resazurin. Estos resultados podrían ser explicados debido a que ROS inducen la peroxidación lipídica provocando daños a la membrana celular (El-Battawy & El-Nattat, 2013). Puesto que los nucleones son estructuras libres de membranas celulares, probablemente la reacción se lleva a cabo por pequeños restos de membranas que permanecieron adheridas al núcleo.

Otra característica que pudiera explicar la alta actividad metabólica de los núcleos aislados podría deberse a que el resazurin se filtre en el nucleón, sin interferir en los procesos de fragmentación de la cromatina ya que no varían significativamente los porcentaje de fragmentación, entre muestras frescas y núcleos aislados, evaluados por AOT y prueba cometa.

A pesar de que los resultados de fragmentación entre nucleones y muestras frescas de espermatozoides no varían, es importante hacer notar que el número

de estructuras obtenidas a partir de una concentración de 100×10^6 espermatozoides/ml se reduce significativamente, perdiendo aproximadamente el 60%. Esto podría sugerir que las células eliminadas podrían tener daños mayores en el ADN y que no es posible eliminar el 100% de estas células dañadas ya que el espermatozoide humano es una célula lábil comparada con espermatozoides de diferentes especies animales como en bovinos y ratas, que solo presentan la protamina P1 y nulos niveles de histonas (D'Occhio, et al., 2007).

Sin embargo, este hecho es un resultado sorprendente ya que la presencia de esta actividad metabólica abre la posibilidad de seleccionar los nucleones que podrían ser útiles para ICSI y tal vez se podría tener un número adecuado de tasas fertilización y embarazos. Los núcleos aislados de espermatozoides no han sido inyectado en ovocitos humanos, aunque, se han realizado con espermatozoides “decapitados” de hámster teniendo resultados favorecedores, ya que mostraron capacidad fertilizante inclusive desarrollo embrional normal, además de que estas cabezas aisladas fueron criopreservadas (Shoji Kuretake, 1996; Yamauchi, et al., 2002). Igualmente, sería interesante comparar la capacidad fertilizante de los núcleos aislados y espermatozoides humanos sometidos a tratamientos de criopreservación, ya que se ha demostrado que los nucleones de bovino criopreservados, hasta por nueve meses a -5°C , no presentan modificaciones morfológicas (área, perímetro, longitud). En cambio, los nucleones criopreservados a 5° muestran una leve disminución en el área total después de 9 meses de preservación.

En el presente estudio se compararon tres técnicas para la evaluación de la fragmentación de ADN en espermatozoides humanos. La prueba por citometría de flujo y AOT están basadas en el mismo principio, que consiste en inducir la desnaturalización ácida de ADN seguida de la tinción con el fluorocromo metacrómico AO, que es el que identifica, de acuerdo a la fluorescencia, al ADN integro (verde) y al ADN desnaturalizado (rojo). La diferencia de estas dos técnicas radica en el instrumento utilizado para su medición, AOT utiliza el microscopio de epifluorescencia, mientras la otra un citómetro de flujo.

La prueba cometa a pesar de que utiliza el mismo fluorocromo AO no sigue

el mismo principio ya que esta prueba se basa en la electroforesis, donde la cadena rota de se libera del superenrollamiento y migra en la dirección del ánodo. El AO sólo sirve para detectar el ADN pudiendo ser cambiado por otro fluorocromo con afinidad a ADN.

La prueba de citometría de flujo, que fue utilizada en este trabajo, está basada en la prueba SCSA, la cual, es la única prueba que ofrece un parámetro para diferenciar los grados de daño al ADN, el DFI, cuyo valor puede ser predictivo para la fallas de la fecundación *in vitro* o *in vivo* (Evenson & Wixon, 2006). Sin embargo, pocos estudios muestran correlación entre el porcentaje de DFI y parámetros seminales (concentración, morfología y motilidad) (Khalili, et al., 2006).

Con la SCSA es posible obtener el %HDS, el cual ha sido correlacionado con él %DFI y la prueba cometa (Pérez-Cerezales, et al., 2012). Los datos aquí presentados no muestran ese tipo de correlación. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los resultados de la prueba cometa y el %DFI, pudiendo ser estas técnicas comparables a pesar de que el número de células contadas en cada prueba es muy distante, en la prueba cometa se cuenta de 200 a 2000 células mientras que en la SCSA pueden ser evaluados de 5000 a 10000 espermatozoides.

Los resultados varían significativamente al comparar AOT con la prueba cometa y el % DFI, siendo las dos últimas más sensibles. Diversos estudios demuestran que los resultados con AOT son pocos confiables para el uso clínico, ya que se debe encontrar el equilibrio exacto en la concentración de AO. Incluso la AOT depende de la forma correcta del cubreobjetos, ya que si este tiene concavidades puede incrementar la concentración de AO en una parte de la muestra tiñendo demasiado a los espermatozoides. Además, si no se cuenta con un software para facilitar el conteo de espermatozoides según su fluorescencia, los resultados llegan hacer subjetivos (Evenson & Wixon, 2006).

Aunque las técnicas de AOT y SCSA usan condiciones de desnaturalización ácidas seguido por la tinción de AO, la razón por la cual no existe correlación entre los resultados podría ser por los diferentes procedimientos de evaluación. Evenson et al. (1999) sugiere que la microscopia de fluorescencia con AO provee

un panorama general del estado del ADN. AOT es limitada con sólo dos o tres clasificaciones (verde, roja, amarilla) comparado con SCSA, la cual evalúa 1024 canales de fluorescencia roja y verde usando citometría de flujo.

En trabajos anteriores los porcentajes de fragmentación con AOT son mayores que los obtenidos por SCSA (Chohan, et al., 2006), resultados que fueron contrarios con los obtenidos en este trabajo. Se han realizado trabajos comparando soluciones fijadoras para la AOT y estos han mostrado que cuando se utiliza la solución de Carnoy con dos horas de incubación, el porcentaje de fragmentación es más elevado (Chohan, et al., 2004). Lo que explicaría porque los datos con AOT son menores ya que el tiempo de fijación utilizado en este estudio fue de 30 min. Esto último confirma que es más confiable utilizar el % DFI o los resultados de fragmentación con la prueba cometa, ya que el primero nos indica la intensidad de fluorescencia y la prueba cometa nos muestra el desplazamiento de las hebras rotas del ADN lo que hace a las pruebas más sensibles.

Otro dato de que se obtuvo al realizar la citometría de flujo fue el porcentaje de células fragmentadas, el cual difiere con el resto de los valores obtenidos, probablemente porque el % DFI mide la intensidad de fluorescencia y no el color de fluorescencia de células individuales, en este caso asemejaría a AOT. Sin embargo, los porcentajes de fragmentación de estos dos métodos varían, pudiendo ser responsable el tipo de compensación realizada en el citómetro de flujo ya que el AO, al ser un fluorocromo metacrómico, puede emitir diferentes fluorescencias.

9. CONCLUSIONES

La cromatina de espermatozoides de hombres normozoospermicos (concentración/ml y porcentuales de movilidad progresiva y de espermatozoides normales igual o por arriba de los valores mínimos de referencia) tiene una alta concentración de roturas en hebras de ADN, probablemente por la cantidad de sitios lábiles.

La prueba de actividad metabólica, empleando resazurin, nos arroja valores predictivos de la fragmentación de ADN con AOT espermático siendo correlacionados positivamente, ya que el comportamiento reproductivo depende de procesos metabólicos. La evaluación de las tasas metabólicas de los espermatozoides podría proporcionar información más completa acerca de la calidad del semen.

A pesar que el espermatozoide humano es una célula muy lábil, resiste al tratamiento con agentes reductores. No obstante, al obtener núcleos aislados, se pierden gran cantidad en las estructuras resultantes, probablemente algunas que se pierden durante el proceso tengan daños a nivel de ADN ya que el tratamiento de núcleos aislados en humanos disminuye levemente el porcentaje de ADN fragmentado en comparación al de espermatozoides humanos.

Las tres técnicas para evaluar fragmentación fueron útiles para evaluar espermatozoides criopreservados, mostrando que la criopreservación a -20°C induce grandes daños al ADN espermático, siendo indiferente el tiempo de criopreservación de las mismas; por lo que -20°C no es una temperatura idónea para crio preservar espermatozoides humanos que se piensen utilizar en técnicas de reproducción asistida.

Las técnicas de evaluación espermática analizadas en el presente trabajo son de gran valor predictivo del daño del ADN, ya que a pesar de ser metodológicamente diversas, no existen diferencias al comparar la prueba cometa

y el %DFI, siendo la primera una técnica sencilla y de bajo costo que puede ser implementada en análisis previos a someterse a un tratamiento de reproducción asistida

El porcentaje de células con daños de ADN, obtenido mediante citometría de flujo, no muestra ser un valor confiable y predictivo de la estructura de la cromatina en espermatozoides humanos.

El desarrollo de novedosos métodos de diagnóstico ultra-estructural podrían conducir de forma más objetiva a predecir los resultados del uso del material seminal, no sólo para pacientes sometidos a técnicas de reproducción asistida, sino también en procesos de biotecnología reproductiva. Sin embargo, se necesitan ensayos adicionales a gran escala para confirmar un valor predictivo de la integridad de la cromatina espermática, ya que la integridad del ADN es un marcador objetivo de la función del espermatozoide.

10. PERSPECTIVAS

Calcular el grado de fragmentación de ADN de espermatozoides y núcleos aislados sometidos a diferentes temperaturas u obtenidos de individuos con problemas de fertilidad, dividirlos por grados de fragmentación y evaluar la capacidad fertilizante de espermatozoides y nucleones. Así mismo, evaluar la actividad metabólica de cada grupo experimental y correlacionarla con los resultados obtenidos. Si existieron fertilizaciones en los grupos proseguir el estudio hasta el mayor tiempo de supervivencia de los embriones.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, A., y Tamer M. Said. «Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility.» *Human Reproduction Update* 9 (2003): 331-345.
- Ajduk, Anna, Yasuhiro Yamauchi, y Monika Ward. «Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) differs from that of in vitro fertilization (IVF).» *Biology of Reproduction* 75 (2006): 442-451.
- Alves da Motta, Eduardo Leme, y Paulo Serafini. «The treatment of infertility and its historical context.» *Reproductive BioMedicine* 5 (2002): 65-77.
- Arabi, M. «Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa.» *Andrology* 36 (2004): 305-310.
- Boitrelle, Florence, et al. "Cryopreservation of Human Spermatozoa Decreases the Number of Motile Normal Spermatozoa, Induces Nuclear Vacuolization and Chromatin Decondensation." *Journal of Andrology* 6 (2012): 1371-1378.
- Brugo-Olmedo, Santiago, Claudio Chillik, y Susana Kopelman. "Definition and causes of infertility." *Reproductive BioMedicine* 2 (2001): 41-53.
- Chocu, S., P. Calvel, A.D. Rolland, y C. Pineau. "Spermatogenesis in mammals: proteomic insights." *System biology in reproductive medicine* 58 (2012): 179-190.
- Chohan, K. R., J. T. Griffin, y D. T. Carrell. «Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation.» *Andrology* 36 (2004): 321-326.
- Chohan, Kazimir, Jeanine Griffin, Marie Lafromboise, Christopher De Jonge, y Douglas Carrell. "Sperm, Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human." *Journal of Andrology* 27 (2006): 53-59.
- D'Occhio, M.J., K.J. Hengstberger, y S.D. Johnston. «Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival.» *Animal Reproduction Science* 101 (2007): 1-17.
- Davides Michael, Moore Vivienne, Willson Kristyn, Van Essen Philipa, Priest Kevin, Scott Heather y Mgmt B. et al. "Reproductive Technologies and the Risk of

- Birth Defects." *The New England Journal of Medicine* 366 (2012): 1803-1813.
- De Iuliis, Geoffry, Rhiannon Newey, Bruce King, y John Aitken. "Mobile Phone Radiation Induces Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage in Human Spermatozoa." *PLoS ONE* 4 (2009): 1-9.
- Delgado, N. M., M. L. Sánchez-Vazquez, L. Reyes, y H. Merchant-Larios. "Nucleons, I: A model for studying the mechanism of sperm nucleus swelling in vitro." *Archives of Andrology* 43 (1999): 85-95.
- El-Battawy, K., y W. El-Nattat. «Evaluation of Rabbit Semen Quality Using Resazurin Reduction Test.» *Global Veterinaria* 11 (2013): 767-770.
- Erikstein, Bjarte, et al. "Cellular Stress Induced by Resazurin Leads to Autophagy and Cell Death Via Production of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Impairment." *Journal Cell Biochemistry* 111 (2010): 574–584.
- Escobar, Linamaría, Paola Alfonso, y Fabio Aristizábal. «Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales.» *Revista Colombiana de Biotecnología* 11 (2009): 49-56.
- Evenson, D., y R. Wixon. «Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility.» *Theriogenology* 65 (2006): 979–991.
- Evenson, D.P., Z. Darzynkiewicz, y M.R. Melamed. «Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.» *Science* 240 (1980): 1131–1133.
- Fernández_González, R., y otros. «Lon-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring.» *Biology Reproduction* 78 (2008): 761-772.
- Foote, R. «Resazurin reduction and other tests of semen quality and fertility of bulls.» *Asian Journal of Andrology* 1 (1999): 109-114.
- Franco, J. G., y R. L. Baruffi. «Introduction to methods for collecting human gametes in assisted reproduction.» *Reproductive BioMedicine* 2 (2002): 187-197.
- González-Marín, Clara, Jaime Gosálvez, y Rosa Roy. "Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 13 (2012): 14026-14052.

- Gurmankin, Andrea, Arthur Caplan, y Andrea Braverman. «Screening practices and beliefs of assisted reproductive technology programs.» *Fertility and Sterility* 83 (2005): 61-67.
- Hammadeh, M. E., A. S. Askari, T. Georg, P. Rosenbaum, y W. Schmidt. "Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men." *Journal of Andrology* 22 (1999): 155-162.
- Hammadeh, M., S. Greiner, P. Rosenbaum, y W. Schmidt. "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 (2001): 1012-1018.
- Henkel, Ralf, et al. "DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology." *Reproductive Biomedicine Online* 7 (2003): 477-484.
- Holstein, Adolf-Friedrich, Wolfgang Schulze, y Michail Davidoff. «Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment.» *Reproductive Biology and Endocrinology* 1 (2003): 107-123.
- Howards, Stuart S. «Treatment of Male Infertility.» *The New England Journal of Medicine* 332 (1995): 312-317.
- Isachenko, Vladimir, et al. "Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability." *Biology of Reproduction* 71 (2004): 1667-1173.
- Khalili, Mohammad Ali, Fatima Aghaie-Maybodi, Morteza Anvari, y Ali Reza Talebi. "Sperm Nuclear DNA in Ejaculates of Fertile and Infertile Men." *Urology Journal* 3 (2006): 154-158.
- Knobil, Ernst, e Jimmy Neill. *Physiology of Reproduction*. Tercera. Vol. 1. Estados Unidos de America: Elsevier, 2006.
- Mahmoud, A., F. Comhaire, L. Vermeulen, y E. Andreou. "Comparison of the resazurin test, adenosine triphosphate in semen, and various sperm parameters." *Human Reproduction* 9 (1994): 1688-1693.

- Martini , A. C., R. I. Molina , R. D. Ruiz, y M. Fiol de Cuneo. "Obesity and male fertility." *Seminars in Reproductive Medicine* 69 (2012): 102-10.
- Mascarenhas, Maya N., Seth R. Flaxman, Ties Boerma, Sheryl Vanderpoel, y Gretchen A. Stevens. "National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys." *PLOS Medicine* 9 (2012): 1-12.
- Massart, Annelien, Willy Lissens, Herman Tournaye , y Katrien Stouffs. "Genetic causes of spermatogenic failure." *Asian Journal of Andrology* 14 (2012): 40-48.
- Miller, David, Martin Brinkworth, y David Iles. «Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics.» *Reproduction* 139 (2010): 287-301.
- Muratori, M., Marchiani S., Tamburrino L., Tocci V., Failli P., Forti G. y Baldi E. "Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent y relationship with semen parameters." *Human Reproduction* 23 (2008): 1035–1043.
- Nallella, Kiran P., Rakesh K. Sharma, Shyam S. Allamaneni, Nabil Aziz, y Ashok Agarwal. "Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants." *Fertility and Sterility* 82 (2004): 913-918.
- Nawroth Frank, Rahimi Gohar, Isachenko Eugenia, Isachenko Vladimir, Liebermann Maike, Tucker Michael J. y Liebermann Juergen. "Cryopreservation in Assisted Reproductive Technology: New Trends." *Seminars in Reproductive Medicine* 23 (2005): 325-335.
- OMS. *Manual de laboratorio WHO para el examen del liquido seminal*. 2010.
- Ortloff, C., M. Deppe , W. B. Schill, y R. Sánchez. "A new technique to evaluate the ability of cryoprotectors to prevent premature acrosome reaction in human spermatozoa." *Andrologia* 38 (2006): 230–232.
- Pérez-Cerezales, Serafín, Alberto Miranda, y Afonso Gutiérrez-Adán. «Comparison of four methods to evaluate sperm DNA integrity between mouse caput and cauda epididymidis.» *Asian Journal of Andrology* 14 (2012): 335–337.

- Reddy, K., P. Meherji, J. Gokral, y S. Shahani. "Resazurin reduction test to evaluate semen quality." *Indian Journal of Experimental Biology* 35 (1997): 369-373.
- Restrepo, Giovanni, Alexandra Úsuga, y Benjamín Rojano. «Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino.» *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 8 (2013): 69-81.
- Reyes, R., J. C. Flores-Alonso, H. M. Rodríguez-Hernández, H. M. Merchant-Larios, y N. M. Delgado. "Nucleons II: Cryopreservation and Metabolic Activity." *Archives of Andrology* 47 (2001): 23-29.
- Rubes, Jiri, et al. "Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality." *Human Reproduction* 20 (2005): 2776–2783.
- Sarabia, Luis, y María Munuce. «Nuevos valores para el espermograma OMS 2010.» *Revista Médica de Chile* 139 (2011): 548-549.
- Shamsi, M.B., R. Kumar, y R. Dada. "Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction." *Indian Journal of Medical Research* 127 (2008): 115-123.
- Shoji Kuretake, 3 Yasuyuki Kimura, 3 Kazuhiko Hoshi,4 y R. Yanagimachi 2. «Fertilization and Development of Mouse Oocytes Injected with Isolated Sperm Heads'.» *Biology of Reproduction* 55 (1996): 789-795.
- Sotolongo, Barbara , Elisabete Lino, y Steven Ward. «Ability of Hamster Spermatozoa to Digest Their Own DNA.» *Biology of Reproduction* 69 (2003): 2029-2035.
- Stanic, Patrik, Marijan Tandara, Zdenko Sonicki, Velimir Simunic, y Ernest Suchanek. "Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 91 (2000): 67-70.
- Szczygieland, Monika, y Ward Steven. «Combination of Dithiothreitol and Detergent Treatment of Spermatozoa Causes Paternal Chromosomal Damage.» *Biology of Reproduction* 67 (2002): 1532–1537.
- Tejada, RI, JC Mitchell, A Norman, JJ Marik, y S Friedman. "A test for the practical

- evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence." *Fertil Steril* 42 (1984): 87–91.
- Virro, Michael, Kjersten Larson-Cook, y Donald Evenson. «Sperm chromatin structure assay parameters are related to fertilization blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles.» *Fertility and Sterility* 81 (2004): 1289-1295.
- Wang, S., G. Holoyak, G. Liu, T. Bunch, R. Evans, y T. Bunch. "Effects of resazurin on bovine oocyte fertilization and embryo development in vitro." *Animal Reproduction Science* 51 (1998): 205–213.
- Yamauchi, Yasuhiro, Ryuzo Yanagimachi, y Toshitaka Horiuchi. «Full-Term Development of Golden Hamster Oocytes Following Intracytoplasmic Sperm Head Injection.» *Biology of Reproduction* 67 (2002): 534-539.
- Yanagimachi, Ryuzo. "Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals." *Reproductive BioMedicine* 10 (2005): 247-288.
- Zalata, A., N. Lammertijn, A. Christophe, y F. Comhaire. "The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen." *International Journal of Andrology* 21 (1998): 289-294.
- Zrimsek, P., J. Kunc, M. Kosec, y J. Mrkun. "Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality." *International journal of andrology* 27 (2004): 57-62.
- Zrimšek, Petra. "Evaluation of a New Method and Diagnostic Test in Semen Analysis." In *Artificial Insemination in Farm Animals*, by Milad Manafi, 131-153. InTech, 2011.
- Zrimšek, Petra, Marjan Kosec, Janez Kunc, y Janko Mrkun. "Determination of the diagnostic value of the resazurin reduction assay for evaluating boar semen by receiver operating characteristic analysis." *Asian Journal of Andrology* 8 (2006): 343-348.

12. ANEXOS

Abreviaturas

%DFI	Porcentaje del Índice de Fragmentación de ADN
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AI	Inseminación Artificial
AO	Anaranjado de Acridina
AOT	Prueba de Anaranjado de Acridina
CTAB	Bromuro de N,N,N-Trimetil,1-Hexadecan-Amino
DFI	Índice de Fragmentación de ADN
DTT	Dithiothreitol
EC5	Espermatozoides Criopreservados con Crioprotector por Cinco años
ECC	Espermatozoides Criopreservados con Crioprotector por un mes
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ES5	Espermatozoides Criopreservados sin Crioprotector por Cinco años
ESC	Espermatozoides Criopreservados sin Crioprotector por un mes
HSPM	Medio de Preservación para Semen Humano

ICSI	Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides
ISNT	Ensayo In Situ Nick Translation
IUI	Inseminación Intrauterina
IVF	Fertilización In Vitro
MAR	Matriz nuclear
REDOX	Oxido-reducción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCD	Prueba de Dispersión de la Cromatina del Semen
SCSA	Ensayo de la Estructura de la Cromatina en Espermatozoides Terminal Deoxynucleotidyl
TUNEL	Adición de nucleótidos dUDP marcados con transferasa desoxinucleótido terminal

Medio TALP

Concentración

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

Penicilina mg/ml

Osmolaridad 305 ± 3 mOsm

pH = 7.4

Medio para la preservación de espermatozoides humanos (HSPM)

	Concentración
Glicerina	15%
Sacarosa	0.05M
Glicina	1%

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 AOT

	Concentración
Ácido cítrico	0.1M
Na ₂ HPO ₄	0.2M
EDTA	1mM
NaCl	0.15M

pH =6.

Buffer de desnaturalización acida citometría de flujo

	Concentración
Tritón X-100	0.1% (v/v)
NaCl	0.15 M
HCl	0.08M

pH = 1.4

Solución AO citometría de flujo

6µg de AO por ml de buffer

	Concentración
Ácido cítrico	0.1M
Na ₂ HPO ₄	0.2M
EDTA	1mM
NaCl	0.15M

pH = 6.