



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Facultad de Medicina
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tesis para aspirar al título de
Magister en Biología Molecular Médica

“Evaluación del daño nuclear en espermatozoides humanos sometidos a criopreservación”

Autor: Esteban Darío Medina Méndez
Director: Dra. Vanesa Rawe

2014

El siguiente Trabajo de Tesis fue realizado
en el Banco de Semen **REPROBANK™**,
en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires Argentina,
bajo la dirección de la Dra. Vanesa Rawe.



Esteban Darío Medina Méndez
Tesista

Vanesa Yanina Rawe
Director



Humboldt 2433, PB#10 (C1425FUG)
www.repro-bank.com

AGRADECIMIENTOS

El siguiente trabajo es dedicado a todas aquellas personas e instituciones que hicieron posible la realización del mismo.

A mi familia, que aunque en la distancia estuvieron siempre apoyándome emocionalmente y cultivando a diario la fortaleza espiritual. Son ustedes quienes me motivaron para llevar a cabo mis metas, quienes han participado de mis triunfos y se enorgullecen de quienes somos, un estrecho lazo nos une siempre sin importar las barreras y crece bajo el amor inculcado y el respeto que hacen posible que la razón y el aprendizaje no tengan edad, hoy y siempre su legado será inmortal.

A mi mejor amiga, Marina, que bajo su apoyo incondicional su inmenso cariño y constantes palabras de fuerza ha logrado enseñarme la importancia de la amistad y el compromiso diario, valorar las promesas y el cumplir de los sueños que juntos contemplamos.

A mis compañeros y amigos quienes conocí en mi paso por Argentina, por creer y confiar en nuestras capacidades. Mis increíbles colegas de posgrado y amigos de mi paso por este gran país, Fabio, Javiera y especialmente a Cristian por su apoyo, compañía y colaboración.

A mi Directora la Dra. Vanesa Rawe, por haber depositado su confianza en mi, abrirme las puertas de su institución para poder lograr este proyecto y presentarme con orgullo el valor de la dedicación, cultivar en mi la fe científica y otorgarme esta gran oportunidad de crecimiento profesional.

A todo el equipo de REPROBANK Argentina, por su compañía, su ejemplo de profesionalismo y su gran capacidad de trabajo científico que hacen del instituto un lugar único e incomparable a nivel clínico, académico y formativo. Agradezco inmensamente a la Dra. Noelia Cabral por su tiempo, dedicación, por su paciencia y compromiso con el trabajo y por estar presente desde el inicio hasta el final del proyecto en pro a la ciencia, gracias por su infinita colaboración.

A mis profesores y la Universidad de Buenos Aires les doy inmensas gracias por su legado, al comité de ética de la Universidad de Maimónides y a Argentina por su hospitalidad.

Finalmente a todos aquellos científicos y profesionales que creen en sus sueños, luchan por cumplirlos, aportan al mundo con su sacrificio y no dejan de lado la humildad, agradezco y admiro enormemente su ejemplo y capacidad.

Gracias eternas,

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	12
V. MATERIALES Y MÉTODOS	14
VI. RESULTADOS	22
VII. DISCUSIÓN	32
VIII. CONCLUSIONES	46
IX. BIBLIOGRAFIA	47

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
CRIOPRESERVACIÓN	7
LA TÉCNICA	7
CRIOPRESERVANTES	8
LIMITANTES	9
LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA CLINICA	9
IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	12
HIPOTESIS	12
OBJETIVO	12
OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
V. MATERIALES Y MÉTODOS	14
MUESTRAS	14
ANÁLISIS DE SEMEN	14
COMPACTACIÓN NUCLEAR	15
EVALUACIÓN DE HISTONAS	15
EVALUACIÓN DE PROTAMINAS	17
INTEGRIDAD NUCLEAR	19
TEST DE TUNEL	19
CRIOPRESERVACIÓN	21
DESCONGELACIÓN	21
GRADIENTE DE SELECCIÓN	22
VI. RESULTADOS	22
MUESTRAS	22

ANÁLISIS DE SEMEN	22
VALORES INICIALES DE COMPACTACIÓN Y FRAGMENTACIÓN	23
PARAMETROS SEMINALES E INTREGIDAD NUCLEAR	24
COMPACTACIÓN E INTEGRIDAD NUCLEAR	25
CORRELACIÓN ENTRE COMPACTACIÓN E INTEGRIDAD INICIAL	25
TECNICAS DE COMPACTACIÓN NUCLEAR	26
CORRELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS (MIC)	26
ANÁLISIS DE PARAMETROS LUEGO DE LA CONGELACIÓN	27
INTEGRIDAD NUCLEAR Y CRIOPRESERVACIÓN	28
INTEGRIDAD NUCLEAR Y CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA POST-CONGELACIÓN	30
VII. DISCUSIÓN	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
MUESTRAS	33
ANÁLISIS DE SEMEN	33
VALORES INICIALES DE COMPACTACIÓN Y FRAGMENTACIÓN	35
PARAMETROS SEMINALES E INTREGIDAD NUCLEAR	36
COMPACTACIÓN E INTREGIDAD NUCLEAR	37
CORRELACIÓN ENTRE COMPACTACIÓN E INTEGRIDAD NUCLEAR	37
TECNICAS DE COMPACTACIÓN NUCLEAR	40
LA CRIOPRESERVACIÓN Y SU IMPACTO EN GAMETOS MASCULINOS	40
ANÁLISIS DE PARAMETROS BÁSICOS POST CONGELACIÓN	41
ANÁLISIS DE INTEGRIDAD NUCLEAR	42
INTEGRIDAD NUCLEAR Y CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA POST CONGELACIÓN	43
VIII. CONCLUSIONES	46
IX. BIBLIOGRAFIA	47

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Materiales y Métodos

FIGURA 1 AZUL DE ANILINA	16
FIGURA 2 EVALUACIÓN CON CMA ₃	18

Resultados

FIGURA 3 COMPARACIÓN ENTRE LAS DOS TÉCNICAS DE COMPACTACIÓN NUCLEAR	26
FIGURA 4 CORRELACIÓN ENTRE AA Y CMA ₃ –REGRESIÓN LINEAL	27
FIGURA 5 GRAFICO COMPARATIVO ENTRE PARAMETOS PRE-POST CONGELACIÓN	28
FIGURA 6 GRAFICO COMPARATIVO DEL %TUNEL PREVIO – POST CONGELACIÓN	29
FIGURA 7 GRAFICO COMPARATIVO DE INTEGRIDAD NUCLEAR	37
TABLA 1 PARAMETROS SEMINALES EN MUESTRA INICIAL	23
TABLA 2 VALORES INICIALES DE COMPACTACION Y FRAGMENTACIÓN NUCLEAR	23
TABLA 3 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE PARAMETROS ORIGINALES Y %TUNEL	25
TABLA 4 VALORES DE PARÁMETROS BÁSICOS POST CONGELACIÓN (M.TOTAL)	27
TABLA 5 ESTADISTICOS DESCRIPTIVOS PARA %TUNEL EN LOS TRES CASOS	29
TABLA 6 T DE STUDENT. COMPARACIÓN ENTRE LOS %TUNEL PRE/POST CONGELACIÓN	30
TABLA 7 T DE STUDENT. COMPARACIÓN ENTRE LOS %TUNEL POST. CONGELACIÓN	30
TABLA 8 VALORES DEL %TUNEL CORREGIDOS POR VITALIDAD	31

ABREVIATURAS

- ❖ AA: Azul de anilina.
- ❖ ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ❖ ADP: Adenosín difosfato.
- ❖ ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología.
- ❖ ART: *Assisted Reproductive Technique*. Técnicas de Reproducción asistida.
- ❖ BSA: *Bovine Serum Albumin*. Albúmina Sérica de Bovino.
- ❖ CMA3: Cromomicina A3.
- ❖ DE: Desvío estándar.
- ❖ dUTP: Deoxiuridina
- ❖ FITC: Isotiacianato de fluorescencia
- ❖ MSOME: *Motile sperm organelle morphology examination*. Examinación morfológica de organelos de espermatozoides móviles.
- ❖ OMS: Organización mundial para la salud
- ❖ PBS: *Phosphate Buffered Saline*. Buffer Fosfato Salino
- ❖ ROS: Especies reactivas de oxígeno.
- ❖ TdT: Transferasa terminal.
- ❖ TP1: *Transition Protein 1*. Proteína de Transición 1.
- ❖ TP2: *Transition Protein 2*. Proteína de Transición 2.
- ❖ TUNEL Post Grad: Evaluación de integridad nuclear posterior a la congelación en la muestra sometida a gradiente de selección.
- ❖ TUNEL Post Mt: Evaluación de integridad nuclear posterior a la congelación en la muestra total.
- ❖ TUNEL previo: Evaluación de integridad nuclear previa a la congelación.
- ❖ TUNEL: *Terminal dUTP Nick-End Labeling*. Marcado del extremo libre con dUTP.

RESUMEN

Existen numerosas evidencias que la criopreservación de espermatozoides en humanos altera parámetros básicos de su fisiología natural, además de esto puede existir un daño que compromete su integridad nuclear. Esto implica una disminución de la viabilidad y a la vez de su capacidad para fecundar pudiendo limitar su uso en técnicas reproductivas.

El presente estudio busca evaluar si ocurre daño en el núcleo espermático luego de la criopreservación de las células sexuales provenientes de hombres que no consultan por infertilidad. Se utilizaron 44 muestras provenientes de hombres sanos y menores de 40 años, candidatos al programa de donación de esperma de un banco de semen en la República Argentina. Se realizó un espermograma básico inicial para cada muestra y se midió la compactación nuclear mediante AA y CMA₃. Posteriormente se someten las muestras a congelación lenta en nitrógeno líquido y luego son descongeladas para su posterior evaluación. El impacto en la integridad nuclear fue medido mediante TUNEL para evidenciar fragmentación del ADN en tres momentos distintos: antes de la congelación, posterior a la descongelación y posterior a la descongelación sometiendo la muestra a un gradiente de selección. Los datos evidenciaron una distribución normal y se evaluaron mediante el programa estadístico SPSS.

Los resultados obtenidos evidencian que la criopreservación tiene un efecto deletéreo y significativo en la integridad nuclear de espermatozoides de hombres jóvenes y sanos, destacando a su vez la importancia de una selección espermática posterior a la técnica para disminuir el porcentaje de espermatozoides que han sufrido el impacto a nivel estructural y molecular.

ABSTRACT

There is evidence that human sperm cryopreservation altered its natural physiological parameters, however it may induce damage to nuclear integrity. This would result in a decrease of viability and fertilizing ability of sperm samples that would be subsequently used in reproduction techniques.

This study aims to assess whether damage occurs in sperm nucleus of men that don't consult for infertility and their sperm have being exposed to cryopreservation. 44 samples from healthy men under 40 years old that are candidates for a sperm donation program of a sperm bank at the Argentine Republic were used. A basic sperm analysis was performed for each sample and chromatin packaging was assessed with CMA₃ and Aniline blue. Samples are subsequently frozen at slow rates in liquid nitrogen and got thawed for further analysis. Nuclear integrity was assessed using TUNEL test, showing evidence of DNA fragmentation at three phases: before freezing, after thawing and after thawing and selected by a sperm separation gradient. Data shows normal distribution and was performed using SPSS software.

Results from the current investigation show that cryopreservation induce a deleterious and significant effect at nuclear sperm integrity of healthy and young men, we emphasize on the importance of a sperm selection method after freezing/thawing techniques to reduce the percentage of sperm with structural and molecular injury rates.

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides son células haploides, altamente diferenciadas, que tienen como función principal la formación de un cigoto totipotente al fusionar su núcleo con el del gameto femenino. En el ser humano, el espermatozoide maduro presenta una serie de características que los diferencian y otorgan su capacidad fecundante y competente dentro del tracto sexual femenino (Ainsworth, 2005). En términos generales los espermatozoides eyaculados constan de una cabeza de forma piriforme y un flagelo que les confiere movilidad. En la región cefálica pueden reconocerse estructuras como el acrosoma y el núcleo, mientras que en la región caudal se encuentra la pieza media, el flagelo y su pieza terminal (Ardon, F. *et al.* 2008)

Una de las características que diferencia la espermatogénesis en mamíferos es la forma en que la cromatina espermática es empaquetada dentro del núcleo (Balhorn 1982) el cual ocupa alrededor del 65 % de la cabeza y contiene toda la información genética proveniente de línea paterna (Carrell *et al.*, 2007). Su cromatina se encuentra en un mayor grado de compactación que la presente en células somáticas (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2000) gracias a la asociación existente entre el ADN, la matriz nuclear y las nucleoproteínas presentes (Shaman *et al.*, 2007). Este nivel de compactación tan eficiente se logra a través de metilaciones, fosforilaciones, ADP-ribosilaciones y ubiquitinizaciones sitio específicas que sufren las histonas testiculares (Oliva, 2006; Carrell *et al.*, 2007) lo que permite la relajación del ADN enrollado, de esta forma se facilita el remplazo de las mismas por

nucleoproteínas *transitorias* (TP1 y TP2) y finalmente por protaminas (Aoki *et al.*, 2005) que forman un complejo *núcleo-protamina* altamente compactado (Oliva, 2006).

Alrededor de un 85% de histonas testiculares son remplazadas por protaminas (Balhorn *et al.*, 1999; Braun, 2001; Miller *et al.*, 2010) a su vez la estabilidad de la cromatina se debe a fuerzas tanto inter como intramoleculares entre la carga neta positiva de las cisteínas y argininas presentes en las protaminas resultantes y la carga negativa de los grupos fosfatos del ADN (Oliva, 2006); además de la formación de puentes disulfuro necesarios para el correcto empaquetamiento del material genético del espermatozoide. (Fuentes-Mascorro *et al.* 2000).

Es importante destacar que el ADN espermático carece de un sistema de reparación eficiente y una manera de remediarlo puede ser la protección otorgada por este proceso de remodelamiento nuclear para así asegurar la integridad de la línea germinal masculina (Ahmadi A, & Ng SC, 1999). Desde la producción, maduración y transporte de los gametos masculinos existen diversos factores tanto intrínsecos como extrínsecos que repercuten en la aparición de daño sobre el ADN espermático tanto a nivel mitocondrial como nuclear (Álvarez, 2011).

Este mecanismo de compactación es necesario para generar un núcleo hidrodinámico capaz de transportar todo el material genético proveniente de la línea paterna y de protegerlo del ataque de nucleasas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y mutágenos presentes a través del tracto reproductivo.

Un factor intrínseco del gameto es la compactación incompleta de la cromatina la cual está relacionada con el remplazo de histonas a protaminas como fue mencionado anteriormente. Las concentraciones anormales de protaminas se encuentran asociadas con alteraciones en la espermatogénesis (Carrell *et al.*, 2007) y una capacidad funcional disminuida. Según un estudio realizado por Oliva en el 2006, la alteración en la proporción de protaminas impacta diferencialmente en la integridad nuclear de espermatozoides en pacientes infértiles confirmando su correlación con una condensación incompleta de la cromatina y su vulnerabilidad frente a agentes exógenos que promueven el daño nuclear.

En el proceso de remodelamiento, la rotura de las cadenas nucleotídicas mediante la acción de la topoisomerasa es un proceso natural para liberar el estrés torsional que existe durante la condensación del ADN espermático (Aitken & De Lullis, 2010), de igual forma esta enzima es capaz de volver a pegar las cadenas selectivamente mediante procesos de fosforilación en sus histonas. La cadena de ADN únicamente cambia su conformación estructural al ser empaquetada (Wang, 2009), sin embargo alguna deficiencia en el proceso de estructuración por parte de la topoisomerasa podría generar un ADN espermático altamente fragmentado (Paull *et al.*, 2000; Celeste *et al.*, 2003; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003).

Otra de las hipótesis planteadas que intervienen en la fragmentación nuclear es la apoptosis abortiva, en donde algunos hombres pueden presentar fallas en la marcación y correcta selección de espermatozoides que debieron haber sido eliminados por esta vía incrementando la población de gametos que puedan presentar anomalías (Androl, J. 2006).

Por otra parte, el complejo de núcleo protaminas presenta una concentración muy baja de moléculas de agua y así se reduce la liberación y el ataque masivo por radicales libres (Geneser, 2006). En diversos estudios se ha descrito que la presencia de radicales libres de oxígeno es una causa importante de lesión en el ADN del espermatozoide, bien sean provenientes de espermatozoides anormales, leucocitos debido a alguna infección, o a una disminución en la capacidad antioxidante del semen (Barroso, 2000; Agarwal, 2003; Moustafa, 2004). Uno de los grupos oxidantes más conocidos en este caso son las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Aitken *et al.*, 1989). En este punto cabe destacar que una concentración mínima de ROS es necesaria para el correcto funcionamiento espermático como lo es su capacitación y su reacción acrosómica (Angelopoulou *et al.*, 2007) sin embargo el volumen citoplasmático tan limitado de los espermatozoides hace que carezcan de suficientes enzimas degradantes de exceso de ROS, lo que los convierte en células dependientes de la protección antioxidante ofrecida por el tracto reproductor masculino (Aitken & De Luliis, 2010).

En 1997 Sun y colabores reportaron la correlación negativa que existe entre el potencial fecundante de los espermatozoides tanto *in vivo* como *in vitro* con la alteración de la integridad nuclear presente en ellos y destacan su importancia a la hora de alcanzar buenos resultados en la clínica. Del mismo modo Cortez-Gutiérrez y cols. en el 2007 afirman que la integridad de la molécula de ADN espermático es esencial para llevar a cabo una fecundación con éxito.

En la literatura existen estudios que demuestran que el ovocito posee un mecanismo de reparación del ADN paterno y que puede desencadenarse

posteriormente a la fecundación (Cox *et al.*, 2002; Wells, 2005), sin embargo esto depende de cada una de las células sexuales femeninas y las condiciones en las que éstas se encuentren. La calidad citoplasmática y genómica del ovocito se ven altamente afectadas por la edad de la mujer, (Sakkas & Álvarez, 2009; Cabral, 2012) de igual forma la calidad del ADN espermático también se ve influenciada por la edad paterna, siendo dos limitantes para la capacidad de reparación por parte del gameto femenino (Sakkas & Álvarez, 2009).

Como fue mencionado anteriormente, el espermatozoide carece de mecanismos eficientes de reparación nuclear (Ahmadi A, & Ng SC, 1999), sin embargo esto no los hace totalmente incapaces de fertilizar (Tomlinson 2001), sugiriendo que parte del ADN paterno es transmitido al embrión con fallas de alteraciones meióticas y o aneuploidías ((Cox *et al.*, 2002; Amor & Halliday, 2008; Sakkas & Álvarez, 2009) que muy posiblemente pasen desapercibidas en tratamientos de reproducción (Yamauchi *et al.*, 2011). En la medicina reproductiva y mediante el uso de técnicas de reproducción asistida (ART), una baja calidad del ADN nuclear se vincula al incremento de abortos espontáneos, fallas en la fertilización, un pobre desarrollo embrionario y bajo índice de implantación (Berkovitz, 2006; Bungum *et al.*, 2004; Henkel *et al.*, 2004; Pérez-Crespo *et al.*, 2005; Zini *et al.*, 2008; Aitken *et al.*, 2011).

Criopreservación

1. La técnica

Al someter células o tejidos a congelamiento se suspende la actividad biológica de los mismos y se mantienen en un estado de *latencia* por un periodo de

tiempo. El nitrógeno líquido es el medio que normalmente se utiliza en la congelación biológica, donde las muestras son sumergidas permanentemente hasta el momento de su descongelación y posterior uso clínico o investigativo.

El reporte del tiempo máximo de criopreservación de esperma es de 21 años (Calamera, 2008) donde a temperaturas entre -80 y $-195,79$ °C se logra detener el metabolismo del espermatozoide. En las ART se han adoptado varias metodologías para lograr la congelación de gametos; la recepción por donantes en los bancos de semen, motivaciones personales y casos particulares de tratamientos quirúrgicos o invasivos en los que el factor masculino se ve drásticamente afectado, son ejemplos en los cuales la criopreservación es clave (Thomson, 2010) siendo ésta, en la mayoría de los casos la única alternativa para lograr embarazos en un futuro (Zribi, 2010).

2. Criopreservantes

Son aquellos compuestos utilizados en la congelación para otorgar protección al mantener tejidos o células a bajas temperaturas. Presentan un grado de afinidad con el agua intracelular y evitan la formación de cristales altamente dañinos (Vutyavanich, 2010). Según su funcionamiento se clasifican en agentes penetrantes y no penetrantes de la célula (Thomson, 2010).

Los agentes penetrantes son permeables a través de la membrana, su función es desplazar el agua al interior de la célula y reemplazarla por el contenido del mismo. Algunos de estos criopreservantes son utilizados en velocidades de congelación muy lenta, el dimetil sulfóxido y el glicerol son ejemplos de este tipo. Por el contrario los

agentes no penetrantes, constan de un peso molecular mayor y no ingresan en la célula con el fin de deshidratarla a altas velocidades de congelación, un ejemplo de esta categoría son las lipoproteínas de la yema de huevo, en inglés conocido como *TEST-yolk buffer*, (Hallark, 2000). Hoy en día existen variantes y combinaciones entre los tiempos y los criopreservantes estandarizados por el laboratorio que los va a emplear.

3. Limitantes

Los procedimientos de congelación y descongelación deben respetar tiempos y temperaturas indispensables para mantener el material celular en las mejores condiciones posibles. Paradójicamente las concentraciones a las que se trabajan los criopreservantes son altamente tóxicas para las células en temperatura ambiente (Thomson, 2010), por lo cual es indispensable el lavado minucioso de la muestra posterior a la descongelación. Lo anterior se complementa con el hecho que el verdadero umbral de supervivencia se da en dos momentos claves del procedimiento: la congelación y la descongelación, donde se afectan gravemente las células incluso al grado de perder su actividad original (Hallark, 2000).

4. La Criopreservación en la Clínica:

Los adelantos en las ART han permitido la criopreservación (o congelamiento) tanto de embriones como gametos en tratamientos de fertilización asistida, lo que confiere a muchas parejas la oportunidad de tener hijos según su caso particular; sin embargo, aun con su uso generalizado las técnicas de criopreservación son perfeccionadas continuamente y evaluadas respecto al impacto intracelular que reciben las células.

Particularmente, con la introducción de la criopreservación de semen, diversos autores han evaluado los daños que sufre el espermatozoide en el proceso de congelación y descongelación (Boitrelle *et al.*, 2007). Se ha demostrado que tanto la viabilidad como la movilidad espermática disminuyen notablemente al descongelar las muestras (Zribi *et al.*, 2010); la morfología es otro de aquellos parámetros que se ven afectados y pueden ser detectados fácilmente en los laboratorios de reproducción (Bell *et al.*, 1993; O'Connell *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2012); sin embargo la mayoría de métodos que se utilizan actualmente para evaluar la integridad nuclear en espermatozoides que han sido congelados no son de rutina en los laboratorios clínicos (Gandini, 2006).

La crio injuria podría estar implicada en los procesos de fragmentación del ADN espermático (Oehninger *et al.*, 2000) y cambios en la membrana acrosomal o mitocondrial que pueden alterar el éxito fecundante (O'Connell *et al.*, 2002), puede alterar la calidad del núcleo espermático dando como resultado una *descondensación prematura* de la cromatina e induciendo un daño sutil a estos espermatozoides que incluso podrían llegar a superar los métodos selectivos para procedimientos de reproducción asistida (Watson, 2000; Boitrelle *et al.*, 2007; Di Santo *et al.*, 2012). Según Said y colaboradores en el 2010, el descongelamiento de espermatozoides está correlacionado con el incremento en el nivel de marcadores apoptóticos limitando así la población de células viables para el uso en tratamientos de reproducción.

Existe una controversia actual respecto a si la técnica confiere un impacto negativo o no sobre el núcleo de los espermatozoides (Zri, *et al* 2010); estudios como los presentados por Duru y colaboradores en el 2001 e Isachenko en el 2004 afirman que no existe daño alguno, mientras que Donnelly y colaboradores en el 2001 al igual que De Paula en el 2006 evidencian un incremento en el daño del ADN espermático tras la criopreservación. El problema se plantea al cuestionar el efecto que tiene la técnica en diferentes parámetros intracelulares y si este es dependiente del tipo de muestra espermática; sea un paciente que consulta por infertilidad o un posible hombre sano con alta probabilidad reproductiva.

Reconociendo la importancia que tiene la integridad del ADN espermático para alcanzar un desarrollo embrionario óptimo (Lopes S. *et al.*, 1998) y teniendo en cuenta la discusión actual que existe sobre el efecto intracelular de la criopreservación de espermatozoides, es de suma importancia la evaluación de la técnica, su impacto a nivel nuclear (incluso de espermatozoides que permanecen móviles después del descongelamiento) y su posible mejoramiento en el campo de la medicina reproductiva.

El presente estudio se realizó con el fin de determinar si existe un impacto negativo por parte de la criopreservación en espermatozoides de un grupo de hombres jóvenes y sanos que son **candidatos** al programa de donación de gametos del banco de semen REPROBANK™ y comparar los resultados con la bibliografía actual en individuos que consultan por infertilidad. La evaluación inicial consiste en medir características básicas espermáticas, tales como la concentración, vitalidad, movilidad y morfología. El análisis intracelular se determina midiendo los niveles de

empaquetamiento de la cromatina y el daño directo a nivel nuclear (ensayo de fragmentación del ADN) pre y post congelación.

HIPÓTESIS

El proceso de congelación y descongelación de espermatozoides humanos tiene un impacto profundo y evidenciable en la estructura y conformación del núcleo espermático.

- Algunos parámetros seminales e intracelulares previos a la congelación son predictores del impacto de la técnica y su interferencia en tratamientos de fertilidad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el impacto del proceso de congelación/descongelación en espermatozoides de un grupo de hombres sanos y jóvenes candidatos al programa de donación de un banco de semen.

Objetivos específicos

- Evaluar las características seminales que son consideradas importantes en la capacidad fecundante de espermatozoides humanos antes y después del proceso de criopreservación.
- Determinar si existe una relación entre el nivel de compactación de la cromatina espermática y la vulnerabilidad de su ADN a ser dañado por crio-injuria.
- Evaluar las técnicas de detección de daño de ADN como posibles predictores del deterioro nuclear espermático luego de ser sometidos a congelamiento/descongelamiento.
- Comparar los resultados con estudios previos en pacientes infértiles y de este modo evaluar si el impacto de la criopreservación es o no dependiente de las características de las muestras espermáticas y/o de la condición de infertilidad del hombre.

Muestras

El estudio incluye 44 muestras de hombres entre 18 y 40 años, que por sus características fisiológicas y genéticas cumplen con las condiciones de ser **posibles candidatos** de donantes de semen de REPROBANK™. Todos los individuos han sido sometidos a consulta clínica y psicológica, incluyendo urocultivo, estudios de enfermedades de transmisión sexual, al igual que presencia de patologías testiculares que comprometan específicamente la función reproductiva del individuo (varicocele, criptorquidia, quistes de epidídimo, etc.). La obtención de las muestras se realizó por masturbación, con 2-5 días de abstinencia sexual en un recipiente estéril y se procesaron dentro de la primera hora post extracción.

El proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Maimónides. Todos los integrantes firmaron un consentimiento informado en el cual se les explicó los alcances del proyecto de investigación. Las muestras fueron clasificadas con un código numérico para preservar la identidad del donante y la información obtenida se mantiene de modo confidencial, siguiendo las reglamentaciones éticas, legales y jurídicas establecidas en las normas bioéticas nacionales – Disposición ANMAT 5330/97– e internacionales -Código de Núremberg, la Declaración de Helsinki y sus modificaciones (AMM, 1964).

Análisis de Semen

Las muestras fueron colectadas mediante masturbación en contenedores estériles, los individuos presentaban de 2 a 5 días de abstinencia sexual.

Posteriormente se realizó el espermograma básico analizando las muestras dentro de la primera hora post-extracción el cual comprendía la medición del volumen (ml), el pH, viscosidad, y los parámetros microscópicos como la concentración espermática (10^6 espermatozoides/ml), la movilidad progresiva (a+b), la vitalidad y morfología según el criterio de Kruger acorde a los parámetros sugeridos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010).

A cada muestra de candidato a donante se le tomó una alícuota previa a congelarse para cada uno de los siguientes procedimientos: Azul de Anilina (AA), Cromomicina A3 (CMA₃) y test de TUNEL; el volumen restante fue destinado a congelación. Posterior a su descongelación se realizó nuevamente el ensayo de TUNEL para un volumen que representaría la *muestra total* (sin selección espermática) y otro ensayo de TUNEL para el volumen restante que se sometió a selección espermática por el gradiente ISOLATE®. Además de esto, se volvió a medir la movilidad y la vitalidad de los espermatozoides recuperados con el fin de evaluar si la criopreservación altero estos parámetros.

Compactación Nuclear

Evaluación de Histonas

La evaluación con Azul de Anilina permite evidenciar la presencia de histonas (Auger *et al*, 1990). Las histonas tienen un alto contenido de lisina, un aminoácido que es afín con el AA y permite la *tinción* positiva de la técnica mostrando un color azul intenso sobre los núcleos de los espermatozoides que las contengan, (Hammadeh *et al.*, 2001) sugiriendo así, que se tratan de gametos inmaduros o que no han llevado a cabo una correcta espermatogénesis y por ende su contenido

nuclear es vulnerable al no tener un alto grado de compactación de su cromatina. En el presente análisis se tomaron sugerencias bibliográficas de la técnica (Auger *et al*, 1990) como también las presentadas por Boitrelle, F. y colaboradores (2012) y Cabral, N. (2012) donde se considera positivos los espermatozoides que presenten más del 50% del núcleo coloreado (Figura 1).

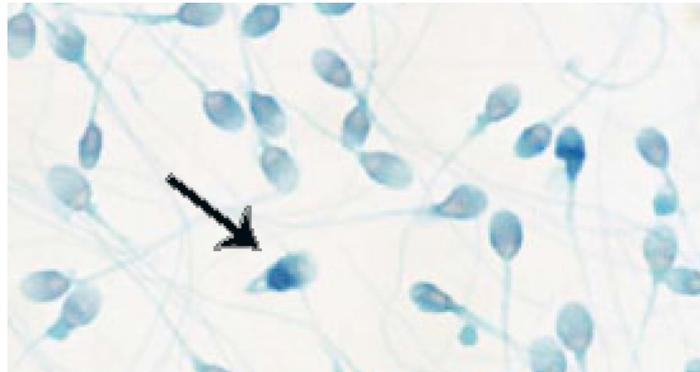


Fig. 1. Azul de Anilina. Las células que presentan núcleos inmaduros presentan un color azul intenso (flecha negra), mientras que los núcleos maduros no presentan afinidad con el colorante presentando una coloración más clara.

Protocolo:

1. Se extrajo una alícuota de la muestra seminal original que debía contener al menos 5×10^6 de espermatozoides totales.
2. Se realizaron 3 lavados con PBS (Sigma-Aldrich. P3813-10PAK) cada uno con previa centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos para eliminar el plasma seminal.
3. Se re suspendió el pellet obtenido en 500µl de PBS.
4. Se realizó un extendido por duplicado en un portaobjetos de vidrio (~100µl en cada uno).
5. Se dejó secar a temperatura ambiente por algunas horas.
6. Se procedió a la fijación de los extendidos en metanol absoluto frío por 10 minutos.

7. Se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente por unos minutos.
8. Se tiñeron los extendidos con una solución de Azul de Anilina (50mg de azul de anilina/ml de ácido acético glacial y agua destilada 4:100. BIOPUR C.I.42755) durante 3 minutos.
9. Los extendidos se lavaron con agua destilada para remover el exceso de colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente.
10. Se contaron 500 espermatozoides bajo microscopio convencional a 100X.

Evaluación de Protaminas

Se realiza mediante la técnica de Cromomicina (CMA₃) un fluorocromo que se inserta específicamente a regiones ricas en guanina-citosina y compite con las protaminas por ocupar los mismos lugares en la cadena de ADN (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007) permitiendo evidenciar una deficiencia de protaminas al presentar una *tinción* positiva (Bianchi *et al.*, 1993). Los espermatozoides que en su núcleo presenten una coloración *verde intenso* (positivos) se relacionan con un nivel deficiente de empaquetamiento de la cromatina (Figura 2) (Manicardi *et al.*, 1995). Los valores normales se consideran a partir de $\geq 70\%$ de espermatozoides *negativos* en la técnica.

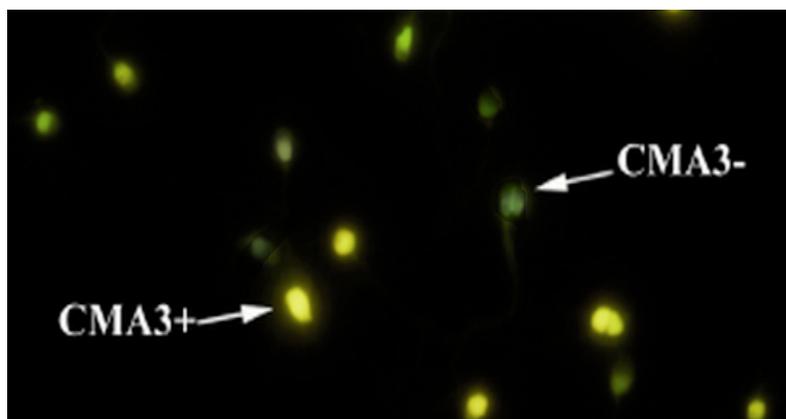


Fig. 2. Evaluación con CMA₃. Las células con núcleos maduros se ven de color verde opaco, mientras que los núcleos inmaduros se ven de verde intenso.

Protocolo:

1. Se extrajo una alícuota de la muestra seminal original que debía contener al menos 5×10^6 de espermatozoides totales.
2. Se realizaron 3 lavados con PBS (Phosphate Buffered Saline pH 7,4. Sigma-Aldrich. P3813- 10PAK) cada uno con previa centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos para eliminar el plasma seminal.
3. Se re suspendió el pellet obtenido en 500 μ l de metanol absoluto frío. Se almacenó en freezer a -20°C hasta su uso.
4. Se sembraron 7 μ l de cada muestra en porta objetos multi-wells (Microscope Slide. Biotraza.Cat.7101).
5. Se incubó junto a 7 μ l de CMA3 [Sigma-Aldrich #C2659, 0,25mg/ml de CMA3 en buffer Mc.Ilvane (16,47ml de Na₂HPO₄ 0,2M con 3,53ml de Citrato 0,1M y 0,51g de MgCl₂)] en oscuridad por 20 minutos.
6. Se realizaron tres lavados con buffer Mc. Ilvane para retirar el exceso de CMA3 dejando incubar 2 minutos entre cada lavado.
7. Se dejó secar el portaobjetos a temperatura ambiente por algunos minutos.

8. Se montó con medio de montaje Vectashield H-1000 (Vector Labs. Inc.) para retardar la pérdida de fluorescencia.
9. Se contaron 500 espermatozoides de cada muestra con microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E200), a 40X de aumento.

Integridad Nuclear

Test de TUNEL

El objetivo de la técnica es evidenciar el grado de fragmentación nuclear existente en las cadenas de ADN de los espermatozoides (Zribi, N *et al.*, 2010). Se basa en una reacción catalizada mediante la enzima TdT transferasa terminal, en donde un nucleótido marcado (deoxiuridina dUTP) es incorporado a los extremos libres 3'-OH en caso de existir alguna ruptura de la cadena nucleotídica.

Las muestras fueron analizadas bajo microscopio de epifluorescencia con isotiocianato de fluoresceína FITC como molécula trazadora. Todas las muestras de los candidatos fueron evaluadas mediante el test de TUNEL previamente <<TUNEL previo>> y a posteriori de la criopreservación analizando en este último caso una muestra total <<TUNEL Post Mtotal>> y una muestra sometida a selección espermática post gradiente <<TUNEL Post Grad>>.

Protocolo:

1. Se extrajo una alícuota de la muestra seminal original que debía contener al menos 5×10^6 de espermatozoides totales.

2. Se realizaron 3 lavados con PBS (Phosphate Buffered Saline pH 7,4. Sigma-Aldrich. P3813- 10PAK) cada uno con previa centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos para eliminar el plasma seminal.
3. La muestra recuperada (~500 µl) se fijó con formaldehído al 2% (Sigma-Aldrich #F1635) en PBS (Sigma-Aldrich. #P3813-10PAK) y fue almacenada a 4°C hasta realizar el conteo.
4. Se concentraron las muestras por centrifugación (5 minutos a 2500 rpm) y se re suspendieron en 100µl aproximadamente.
5. Se sembró 30µl de cada muestra en un portaobjetos multi-well (Teflon Printed Slides. Electron Microscopy Sciences. #63430-04). Previamente el portaobjetos se dejó incubar con poli-lisina (Poly-L-Lysine. Sigma-Aldrich #P4832) durante una semana a 4°C y lavadas 3 veces con agua destilada antes de su uso. Como control negativo una de las muestras fue sembrada por duplicado.
6. El portaobjetos permaneció en cámara húmeda a temperatura ambiente, durante una hora como mínimo.
7. Se absorbió el exceso de muestra con papel tissue y se lavó 3 veces con 15µl/well de PBS durante 3 minutos.
8. Se permeabilizó la membrana con 5 µl de metanol frío/well durante 2 minutos.
9. Se lavó con 15 µl/well de PBS y se absorbió el excedente con papel tissue.
11. Se lavó 4 veces con 15 µl/well de PBS durante 3 minutos. Se secó el excedente con papel tissue.
12. Se incubó cada well con 5 µl de solución TUNEL (Kit Roche Applied Sci., cat. #11684795910) durante 1 hora a 37°C.
14. Se lavó 6 veces con 15 µl/well de PBS durante 2 minutos.
15. Se dejó secar en platina térmica a 37°C.

16. Se montó con medio de montaje Vectashield H-1000 (Vector Labs. Inc.) para retardar la pérdida de fluorescencia.

17. Se contó 500 espermatozoides con microscopio de epifluorescencia a 100X, con filtro para rodamina (568nm) y para FITC (488 nm)

Criopreservación

Se trabajó con una concentración mínima de espermatozoides a congelar de 40×10^6 /ml por donante. Todas las muestras fueron almacenadas en pajuelas de 0,6 ml de volumen. Cada muestra fue sometida a lavados con PBS y centrifugación, para luego ser re suspendida en crioprotector Test-yolk buffer. Después de equilibrarse los contenidos en cada pajueta, las mismas se termosellan y se someten a congelamiento lento que incluye una rampa de temperaturas desde un enfriamiento a 4°C durante 45 minutos, pasaje por vapor de nitrógeno durante 15 minutos y finalmente su preservación en N₂ líquido a -195,8°C.

Descongelación

Las pajuelas son extraídas del tanque de nitrógeno líquido y se dejan 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se desocupa el contenido en un tubo Falcon®, se toman 100 µl para el análisis denominado como “*muestra total*” (sin gradiente de selección) y el resto de la muestra se somete a un gradiente de selección espermática.

Gradiente de Selección

Luego de la descongelación el resto del contenido recuperado de las pajuelas que no se utiliza en el análisis de *muestra total* es sometido a selección mediante un gradiente de separación (ISOLATE®, Irvine Scientific Ref.99264). Los porcentajes de concentración del gradiente son: 90% y 50%. Cada muestra es centrifugada a 1500 rpm durante 15 minutos; posteriormente se recuperan 400 µl incluyendo el *pellet* y se realiza la evaluación de parámetros básicos y TUNEL.

RESULTADOS

En el presente estudio se utilizó el programa SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) para realizar el análisis estadístico. Mediante un Q-Q plot y un análisis de normalidad (K^2) de Pearson se evaluó la distribución de los datos y se encontró que mantenían una Distribución normal.

Muestras

Se recolectaron un total de 44 muestras pertenecientes a un grupo de hombres jóvenes y sanos entre 18 y 40 años de edad candidatos del programa de donación de gametos de REPROBANK™.

Análisis de Semen

Todas las muestras se analizaron según los criterios recomendados en el manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010); de este modo se

obtuvieron los valores medios de la población analizada (Tabla 1) con un n= 44 detallando los parámetros iniciales de volumen (ml), concentración espermática ($10^6/ml$), porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva (a+b) y del porcentaje de vitalidad.

Tabla 1. Valores de los parámetros seminales en la muestra inicial, n = 44.

	Media \pm DE	Límite inferior OMS 2010
Volumen Eyaculado (ml)	2,77 \pm 1,27	> 1.5
Concentración ($10^6/ml$)	120,75 \pm 53,55	\geq 15
% Motilidad (a+b)	68,07 \pm 8,76	\geq 40
% Vitalidad	86,39 \pm 6,14	\geq 58

Todas las muestras que no cumplían con los límites inferiores sugeridos en el Apéndice 1 del manual de la OMS 2010 fueron descartadas del presente estudio, al igual que aquellas en donde el porcentaje de motilidad fuese menor a 40% y de vitalidad al 50% **sin importar** que la concentración y volumen fuesen normales.

Valores Iniciales de Compactación y Fragmentación

Los valores iniciales de compactación nuclear y de fragmentación del ADN mediante TUNEL se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores medios de compactación inicial y fragmentación nuclear previos a la congelación.

	Media \pm DE	Límites de Referencia*
Azul de Anilina (%)	12,84 \pm 7,58	\leq 30%
Cromomicina A ₃ (%)	16,43 \pm 7,64	\leq 30%
TUNEL Previo (%)	24,89 \pm 10,36	\leq 20%

Una eyaculación normal debe contener al menos un 75% de espermatozoides “*negativos*” en la evaluación mediante Azul de Anilina (Dadoune *et al.*, 1988; Hofmann *et al.*, 1991) y alrededor del 70% de espermatozoides “*negativos*” en cromomicina A₃ (Manicardi *et al.*, 1995), sin embargo para esta práctica se consideró un correcto nivel de compactación del 70% en los dos casos.

En el caso de la fragmentación de ADN se toma el valor inferior sugerido por Sergerie y colaboradores en el 2005, siendo una muestra normal aquella que contenga al menos 80% de espermatozoides con TUNEL negativo. El promedio de los datos de fragmentación nuclear es de $24,89 \pm 10,36$ (Tabla 2) superando levemente el límite sugerido, esto puede ser explicado por dos razones: factores externos a los que posiblemente algunos de los individuos se enfrentaron luego de la entrevista inicial y exámenes médicos previos al día de la recolección y por otra parte el valor encontrado puede deberse a la metodología propuesta en este estudio investigativo, en donde el test de TUNEL fue realizado en la *muestra total*, es decir que no se sometió a ningún tipo de selección espermática como lo sugiere el protocolo para diagnóstico clínico y se evaluó toda la fracción espermática del eyaculado.

Parámetros Seminales e Integridad Nuclear

Se realizó una prueba de correlación de Pearson con cada uno de los parámetros seminales previos a la criopreservación y el %TUNEL existente en un comienzo, de esta forma se intenta identificar algún parámetro como posible predictor de fragmentación.

Tabla 3. Análisis de correlación entre los parámetros seminales originales y el %TUNEL.

Parámetros Seminales	% TUNEL	
	<i>r</i>	<i>p</i>
Volumen Eyaculado (ml)	-,068	0,548
Concentración (10 ⁶ /ml)	,080	0,605
% Motilidad (a+b)	,207	0,177
% Vitalidad	,319*	0,035*
Azul de Anilina	-0,43	0,783
Cromomicina A3	0,19	0,902

r= coeficiente de correlación de Pearson, *p*= *p*-value.

La correlación es significativa al nivel $p < 0,05$ (*)

En este caso el único parámetro que demostró tener una correlación lineal positiva con la fragmentación es la vitalidad, con un índice de Pearson de $r = 0,319$; $p < 0,05$ (Tabla 3), aunque existe significancia estadística es una correlación débil con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.1$ por lo cual no se considera que tenga relevancia en la clínica.

Compactación e Integridad Nuclear

Correlación entre Compactación e Integridad nuclear inicial

Para inferir si existe algún tipo de relación estadística entre el nivel de compactación inicial medido por cada técnica y la integridad nuclear original se realizó el análisis de correlación de Pearson mostrado anteriormente en la Tabla 3, donde se obtiene un ($r = -0,43$) para Azul de Anilina y un ($r = 0,19$) para CMA₃, lo que evidencia que aunque existen niveles de compactación considerados normales (Dadoune *et al.*, 1988; Hofmann *et al.*, 1991; Manicardi *et al.*, 1995) no necesariamente significa que no exista un nivel de fragmentación inicial.

Técnicas de Compactación Nuclear

No se encontraron diferencias significativas entre las dos técnicas para medir compactación, ($t(43) = -1.93$; $p > 0.05$). La Figura 3 permite evidenciar una tendencia similar para cada una de las 44 muestras entre los valores encontrados por AA y por CMA₃; sin embargo en algunos puntos se observa que los valores del conteo por CMA₃ tienden a estar levemente por encima posiblemente a errores sistemáticos en la medición.

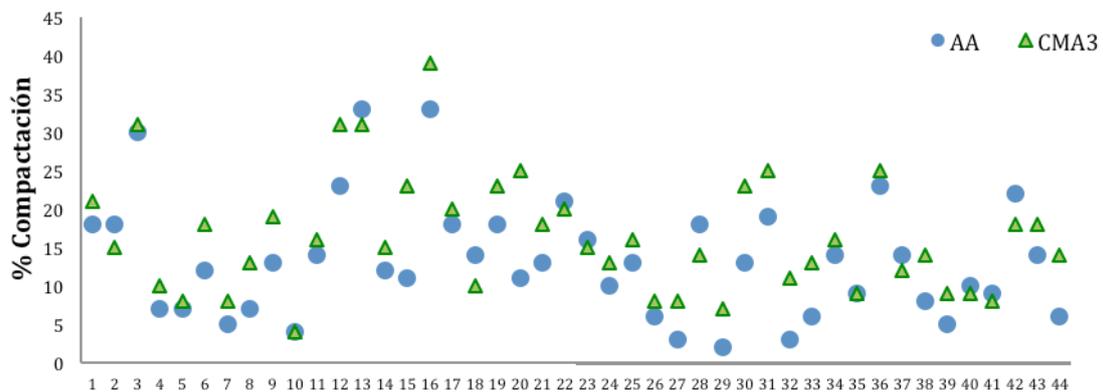


Fig. 3 Comparación entre las dos técnicas para medir compactación nuclear; AA: círculo azul, CMA₃: triángulo verde.

Correlación entre las Técnicas

La Figura 4 evidencia una correlación lineal positiva entre las dos técnicas para medir la compactación nuclear.

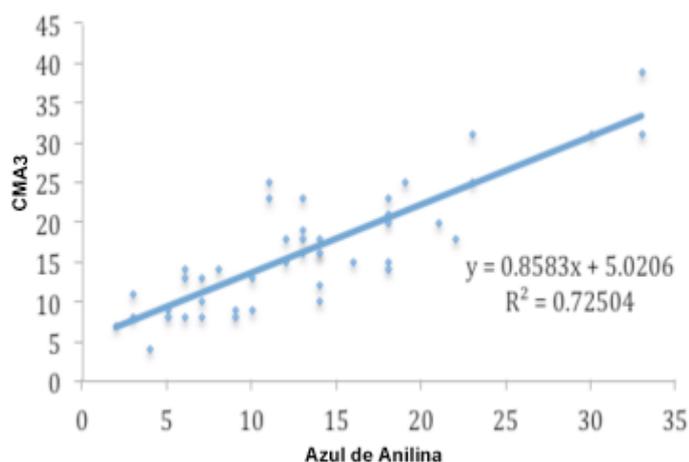


Fig. 4 Regresión Lineal entre AA y CMA₃. Se obtiene un R² de 0,72; r de Pearson =0,85.

El índice de correlación de Pearson es de ($r = 0,85$; $p < 0,5$; un $R^2 = 0,72$) sugiriendo que las dos técnicas se corresponden entre sí.

Análisis de Parámetros seminales luego de la Congelación

Posterior al proceso de criopreservación se realizó nuevamente la medición de los parámetros de movilidad y vitalidad en cada muestra para evidenciar algún posible cambio con los obtenidos en la Tabla 1. Los nuevos valores se presentan a continuación:

Tabla 4. Valores de los dos parámetros seminales básicos en la *Muestra total* post congelación, n = 44.

	Media ± DE	Límite inferior OMS 2010
% Motilidad (a+b)	25,8 ± 18	≥ 40
% Vitalidad	46,35 ± 17,82	≥ 58

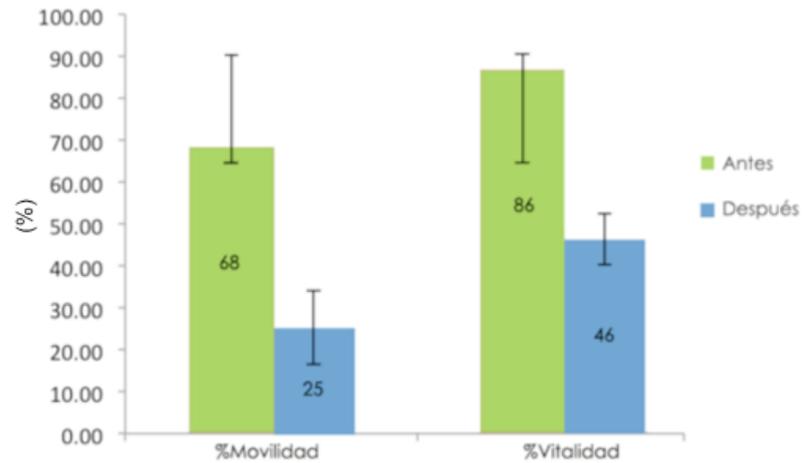


Fig. 5 Grafico comparativo entre los valores promedio de dos parámetros seminales en las 44 muestras antes y después de la congelación sin gradiente de selección.

Al someter a las muestras a congelación se obtiene una disminución de los dos parámetros analizados con diferencias significativas (Tabla 4): *%Vitalidad* ($t(43) = -23$; $p < 0,001$) y *%Movilidad* ($t(43) = 13,6$; $p < 0,001$), reflejando un impacto negativo en ambos casos como se puede observar en la Figura 5 y presentando valores por debajo a los límites inferiores sugeridos por la OMS 2010.

Integridad nuclear y Criopreservación

La Tabla 5 presenta los valores de las medias encontradas para los tres casos en que se midió fragmentación: TUNEL previo a congelación (*TUNEL Previo*), Post congelación en Muestra Total (*TUNEL Post Mt*), TUNEL Post congelación después del gradiente de selección espermática (*TUNEL Post Grad*):

Tabla 5. Estadísticos descriptivos para fragmentación mediante %TUNEL en los tres casos.

	N	Media	± DE
%TUNEL Previo	44	24,89	10,3
%TUNEL Post Mt	44	40,7	11,7
%TUNEL Post Grad	44	35,82	14,6

Los valores presentados en la Tabla 5 se pueden evidenciar gráficamente en la Figura 6:

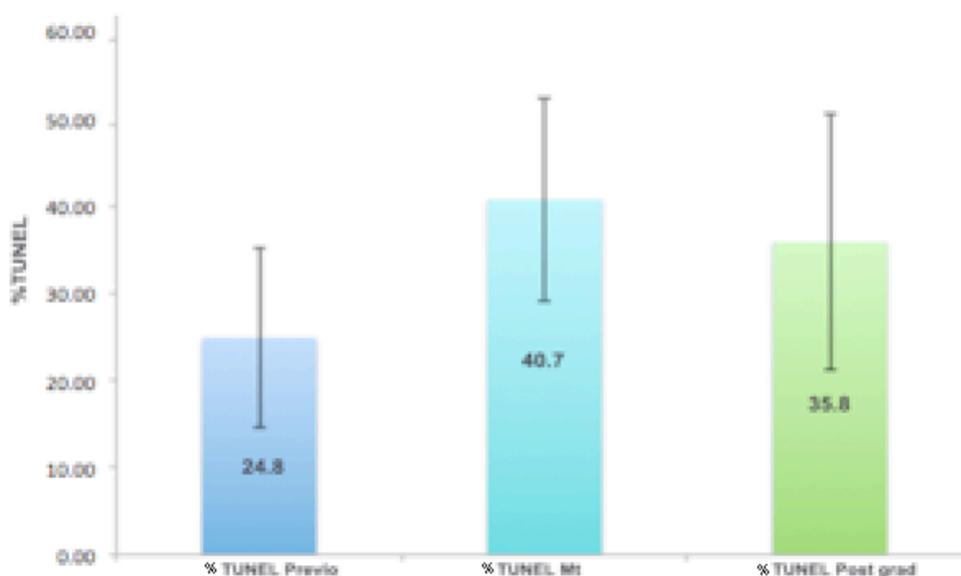


Fig. 6 Gráfico comparativo entre las medias del %TUNEL en los tres momentos: Previo a congelación, luego de la congelación en la *M. Total* y posterior a congelación sometido a un gradiente de selección.

En los tres casos la media de los valores de fragmentación es superior al límite sugerido ($\leq 20\%$) (Sergerie, M. *et al.*, 2005), sin embargo se evidencia un incremento al someter las muestras a congelación (Figura 6).

Para determinar si existen diferencias estadísticas entre los tres casos en que se evaluó la fragmentación nuclear se realizó una comparación de medias con una *T de student* para datos apareados:

Tabla 6. Prueba T de Student. Comparación de medias de los %TUNEL (previo a congelación y los dos análisis posteriores a la descongelación).

	N	t	p(bilateral)
%TUNEL Previo	44	-9,5	0,000
%TUNEL Post Mt			
%TUNEL Previo	44	-5,6	0,000
%TUNEL Post Grad			

Nivel de significancia $p < 0,01$

Al realizar los estadísticos se encuentra que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($t(43) = -9,5$; $p < 0,01$) para el %TUNEL previo a la congelación y la muestra después de ser criopreservada, y ($t(43) = -5,6$; $p < 0,01$) entre el %TUNEL previo a congelación y la muestra después de ser congelada y sometida a selección espermática (Tabla 6), lo que sugiere que efectivamente existe un incremento significativo en el porcentaje de fragmentación.

Integridad nuclear y capacitación espermática (Post-congelación)

Con el fin de identificar si existen diferencias entre los valores de fragmentación nuclear entre la *Muestra Total* (post congelación) y luego de ser sometida a un *Gradiente de selección*, se realiza nuevamente una comparación de medias mediante SPSS:

Tabla 7. Prueba T de Student para comparar medias del porcentaje de fragmentación entre los dos análisis *posteriores* a la descongelación.

	N	t	p(bilateral)
%TUNEL Post Mt	44	2,83	0,007
%TUNEL Post Grad			

%TUNEL Post Mt: Porcentaje de fragmentación de ADN en la *Muestra Total* post-congelación;
 %TUNEL Post Grad: Porcentaje de fragmentación de ADN después del *gradiente de selección espermática* (post-congelación).

El porcentaje de fragmentación de las *Muestras totales* y el porcentaje de fragmentación luego de ser sometidas a un *gradiente de selección* (ambos casos

post-congelación) si cambió entre las mediciones efectuadas con un $t(43) = 2,83$; $p < 0,01$) (Tabla 7), siendo inferior en el caso del gradiente como fue detallado en la Tabla 5, reflejando la importancia clínica de una correcta selección espermática.

Teniendo en cuenta que en la práctica los gradientes de selección son utilizados para eliminar una gran proporción de espermatozoides muertos y que con este método se busca obtener una fracción de espermatozoides que hayan sobrevivido el proceso de criopreservación, se realizó una corrección de los datos del porcentaje de fragmentación por el valor de vitalidad obtenido, de esta forma se aproxima el valor de la fragmentación existente en el conjunto de espermatozoides vivos:

Tabla 8. Valores del porcentaje de fragmentación corregidos por la vitalidad.

	N	Media
TUNEL Previo	44	21,49
TUNEL Post Mt	44	18,86
TUNEL Post Grad	44	25,06

$$(\%Vitalidad \times \%TUNEL) / 100$$

En los tres casos al corregir el porcentaje de fragmentación por el valor de vitalidad se obtiene una disminución de los mismos (Tabla 8), en el caso particular del *Gradiente de selección*, (siendo este el procedimiento habitual en la clínica luego de una congelación) ocurre una disminución del porcentaje de fragmentación a un 25,06%, este valor se acerca aún más al límite sugerido (Sergerie, M. *et al.*, 2005).

DISCUSIÓN

El factor masculino es cada vez más estudiado y analizado durante los tratamientos de reproducción asistida. En el presente estudio, pretendimos dar luz al entendimiento de lo que acontece más allá del simple espermograma y adentrarnos en procesos intracelulares que podrían servir como herramientas de pronóstico molecular. Los parámetros medidos en un espermograma son herramientas simples muy difundidas pero no garantizan que ese paciente pueda sufrir algún tipo de fertilidad subóptima (Tejada, A., 2006). Como se mencionó anteriormente, la calidad del ADN transportado por un espermatozoide depende de su completa maduración nuclear durante la espermatogénesis y el impacto de diversos factores externos (Álvarez, 2011)

Análisis Estadístico

Es importante aclarar que la significancia estadística aunque arroja información fundamental sobre la probabilidad de que los resultados sean o no atribuibles al azar no siempre son traducibles en datos con relevancia clínica (Lindgren, 1993; Atkins, 2004). La relevancia clínica de la relación entre variables está dada mediante el coeficiente de determinación R^2 en donde se consideran relevantes aquellos valores superiores a $R^2 = 0.5$ ya que estaría explicando al menos un 50% de la variación que tiene la variable dependiente por la variable independiente. Por otra parte, teniendo en cuenta que el tamaño muestral es un tanto bajo con ($n = 44$), cualquier diferencia por pequeña que ésta fuese puede alcanzar significancia estadística, pero su aplicabilidad en la clínica puede ser limitada (Sangrador, 2010).

Muestras

En este estudio solamente se incluyen **candidatos** al programa de donantes de semen de REPROBANK™, los cuales han sido evaluados bajo criterio médico, infectocontagioso, genético y psicológico para acceder a la donación de semen. Fueron considerados hombres con espermogramas básicos normales (OMS 2010) en los cuales las características seminales se encuentran por encima del límite inferior sugerido. Los hombres considerados en nuestro estudio poseían espermogramas normales pero no cumplían necesariamente con el criterio de Cooper y cols., 2005 que define un hombre fértil a aquel que haya logrado concebir en el último año de relación sexual sin protección anticonceptiva. Se podría esperar que los individuos seleccionados en este estudio tengan una alta probabilidad de ser fértiles por su condición clínica aunque no haya sido un criterio de selección inicial.

Mediante la entrevista inicial y la anamnesis médica y estudios de laboratorio a los que fueron sometidos todos los participantes, se lograron descartar posibles variables andrológicas (varicocele, criptorquidia, quistes de epidídimo, etc.), lo que plantea el trabajo en una población más homogénea.

Análisis de Semen

Como se mencionó anteriormente, los valores iniciales de los parámetros básicos se encontraron por encima de los límites inferiores sugeridos por la OMS 2010 (Tabla 1). Se pudo observar que existen valores elevados de desviación estándar en algunos de los parámetros medidos, lo cual puede ser explicado por diversos factores en la recolección, diferencia de días de abstinencia o esperable variabilidad biológica entre los participantes.

En el caso del volumen de eyaculación depende del tiempo de abstinencia y grado de excitación sexual en el que se encuentre el varón (Eliasson, 2003). El valor generalmente oscila entre 2 ml a 6 ml y los valores inferiores a 1 ml se asocian con problemas de la vesícula seminal, pérdida de eyaculación, eyaculación retrograda o estrés (Munuce, 2008). La primera fracción del eyaculado es rica en espermatozoides y fluido prostático (Eliasson, 2003) por lo cual es primordial que el individuo no pierda parte de la muestra en su recolección.

La concentración promedio de todas las muestras fue normal (OMS, 2010), sin embargo tiene una gran desviación. Es necesario aclarar que la medición de estos parámetros siempre estarán asociados a un cierto grado de incertidumbre; en este caso se utilizó cámaras de conteo Makler (10uL) la cual no requiere una dilución previa y permite el conteo de células en muestras concentradas (Munuce, 2008) pero su utilización depende en gran parte del observador. Al igual que el volumen, la desviación de los datos de concentración puede estar relacionado con los días de abstinencia sexual como también con problemas en la recolección o alguna pérdida de fracción en el eyaculado que no haya sido reportada.

El porcentaje de motilidad y vitalidad fueron normales (OMS 2010), y superaron el umbral que se predetermino en este estudio para poder ser sometidos a congelación (Tabla 1). Es importante aclarar que los límites inferiores de referencia OMS 2010 que se utilizaron en este estudio son valores descriptivos de un grupo de hombres que lograron concebir un hijo durante el último año anterior al estudio, lo cual constituye un grupo selecto de individuos y sus características seminales pueden llegar a ser distintas a aquellas de hombres sanos sin problemas de

infertilidad (Cooper *et al.*, 2005), de igual forma el límite inferior corresponde al percentil 5 de una distribución de frecuencias, lo que indica que valores muy superiores a los encontrados en este centilo no se relacionan con patologías ni significan infertilidad masculina.

Por último cabe destacar que los valores de las características seminales son muy variables entre individuos (*variabilidad biológica*), en donde los límites inferiores sugeridos nos permiten tener una idea del estado de fertilidad del varón (Cooper *et al.*, 2005), más no son los únicos determinantes de la misma.

Valores Iniciales de Compactación y Fragmentación.

En la introducción del presente estudio se destacó la importancia de la protaminación en la compactación y protección del material genético en cada espermatozoide, (Ahmadi A, & Ng SC, 1999; Boitrelle, 2012; Álvarez, 2011), facultad que les confiere resistencia al daño generado por agentes externos ya mencionados. Existen estudios que indican mayores tasas de fertilización cuando se utilizaban muestras de semen que presentaban niveles de compactación normales (Yovich, 1994; Bungum, 2004; Oliva, 2006) de igual forma Nasr-Esfahani y cols., 2007 hacen referencia a una relación positiva con muestras que presentan baja fragmentación nuclear y mejores tasas de fecundación. Por otra parte, además de esta reestructuración existente en los gametos, el Zinc de origen prostático ayuda a prevenir la descondensación temprana de la cromatina y aumenta la estabilidad del núcleo espermático (Kvist, 1980, Jeyedran, 1984), razón por la cual algunos autores refieren la utilización del plasma seminal en la criopreservación de esperma de mamíferos como manera de protección ante los posibles efectos negativos de la

técnica (Rodríguez *et al* 1990; Vadnais *et al* 2005; Abad *et al* 2007), cabe recalcar que en la presente metodología empleada se realizaron lavados mediante PBS a las muestras y se eliminó gran porcentaje del plasma seminal.

En nuestro estudio y antes del proceso de congelación, tuvimos 28 individuos (63% del total analizado) con valores de fragmentación del ADN por encima del límite sugerido (Sergeie, M. *et al.*, 2005) lo cual se ve reflejado en el promedio y la desviación (Tabla 2). Estos valores son de esperarse si se considera que en la metodología empleada no se utilizó ningún tipo de selección espermática inicial y se evaluó la fragmentación nuclear de la muestra total de semen sin capacitar (a diferencia del protocolo establecido para el diagnóstico clínico). Lo anterior se estableció con fines **netamente investigativos** para tener una aproximación de los valores *originales* de fragmentación de ADN y evaluar si existe un incremento de ésta al someterse a congelación. Es importante aclarar que los individuos que fueron parte de este estudio son posibles candidatos al programa de donación, lo cual no garantiza que sean elegidos como donantes en nuestro programa de donación de semen.

Parámetros seminales e Integridad nuclear

Para determinar si alguno de los parámetros seminales podría ser utilizado como un predictor del nivel de fragmentación existente se realizó un análisis de correlación de Pearson, de este modo se encontró que la vitalidad fue el único parámetro que mostro correlación con la fragmentación inicial; sin embargo el índice fue bajo (Tabla 3) teniendo poca relevancia en la clínica al explicar tan solo el 10%

de la variación de la fragmentación y por lo tanto no es posible proponerlo como un predictor de la calidad del ADN espermático.

Compactación e Integridad Nuclear

Correlación entre compactación e Integridad nuclear

Como ya ha sido mencionado previamente, es necesario un adecuado nivel de compactación nuclear que confiera un grado de protección al material genético (Ahmadi A, & Ng SC, 1999; Boitrelle, 2012); sin embargo, los niveles normales de compactación del ADN no necesariamente significan ausencia de daño directo o fragmentación del ADN. Sakkas y colaboradores en el 2003 hacen referencia a que existen múltiples razones por las cuales el ADN del espermatozoide maduro puede ser fragmentado además del incorrecto re-modelamiento de la cromatina. Entre estas razones se encuentran la apoptosis abortiva, una actividad anormal de la topoisomerasa o una reparación anormal de las células en el proceso de maduración.

Para inferir si existe algún tipo de relación estadística entre el nivel de compactación inicial medido por cada técnica y la integridad nuclear, realizamos un análisis de correlación con los valores obtenidos previos a la congelación (Tabla 3), sin embargo el índice de Pearson y de correlación es bajo, lo que indica que mediante los parámetros estadísticos utilizados en este estudio no se encuentra una relación entre las variables, aunque no se descarta la existencia de otro tipo de correlación diferente a la lineal.

Esta aparente discrepancia en donde todos los valores de compactación nuclear son considerados normales (Tabla 2) (Dadoune *et al.*, 1988; Hofmann *et al.*, 1991; Manicardi *et al.*, 1995), y algunos de los porcentajes de fragmentación son superiores al valor sugerido (Manicardi *et al.*, 1995) se puede analizar estudiando los diversos factores que causan la alteración de la integridad nuclear; los que producen la fragmentación primaria o intrínseca y por otro lado los factores externos responsables de una inducción en la rotura del ADN espermático (Álvarez, 2007). Por otro lado, en nuestra experiencia como banco de semen encontramos que aproximadamente un 15% de los hombres con parámetros seminales normales, pueden estar cursando con alteraciones indetectables en la fragmentación del ADN espermático (datos no publicados, REPROBANK™ 2015).

Algunos estudios en la literatura indican que los factores primarios estarían relacionados a la incorrecta maduración del gameto masculino en el epidídimo (Sakkas *et al.*, 2003, Álvarez, 2007). En algunos casos existen espermatozoides inmaduros que logran superar los mecanismos de control propios del testículo y no son eliminados. Ésta sería una de las principales razones por las cuales algunos hombres mayores a 45 años presentan un alto grado de fragmentación nuclear y valores anormales de compactación en su cromatina (Rybar *et al.*, 2011). En nuestro estudio los candidatos a ser donantes son personas entre 18 y 40 años, lo que nos haría especular en plantear otras causas (no la edad) responsables de la fragmentación del ADN espermático.

El factor secundario o externo involucra una serie de posibles causas que pueden inducir la rotura del material genético. Algunas de ellas son las intervenciones

quirúrgicas, tratamientos de radioterapia o quimioterapia que pueden generar un daño permanente. En otros casos puede ser un daño transitorio, individuos con presencia de varicocele testicular, fumadores severos, procesos inflamatorios y/o infecciones testiculares o aquellos que han tenido episodios de fiebre o exposición a altas temperaturas (Álvarez, 2007).

Mediante el criterio de selección mencionado y al análisis médico inicial realizado a cada candidato a donante se logran descartar algunos de los factores mencionados, sin embargo no se descarta la presencia de factores externos a los que la persona haya sido sometida después de la primera entrevista médica y los exámenes de ingreso al programa. Este periodo de tiempo en donde comienza la evaluación individual dura aproximadamente 8 semanas siendo un transcurso en donde pueden ocurrir adversidades en los días inmediatamente próximos a la recolección: posibles infecciones, eventos febriles o exposiciones a agentes ambientales que fueron ignorados o no recordados por el individuo y que pueden ser la causa del nivel de fragmentación existente al momento de su análisis. Cabe resaltar que en REPROBANK™, de todos los individuos que inician el proceso de selección para ser donantes, aproximadamente la mitad (46%) son descartados por pobre calidad espermática, 32% de ellos abandonan el programa y sólo un 22% de los candidatos son aptos para continuar con el proceso. En la etapa final, menos del 10% de quienes inician el proceso logran establecerse como donantes (datos no publicados, Regalado, P. 2015). Los 44 individuos analizados en el presente estudio fueron candidatos (no donantes) en el programa de donación y no se asegura que finalmente logren convertirse en verdaderos donantes.

Técnicas de Compactación Nuclear

El uso de CMA₃ y AA es desde hace años de interés clínico ya que ambas pueden utilizarse de manera conjunta o independiente para tener un indicio bastante preciso de los niveles en la compactación de la cromatina espermática, sin embargo su fundamento no es el mismo (Carrell *et al.*, 2007), mientras el azul de anilina tiene afinidad por la lisina de las histonas, la cromomicina se inserta en regiones del ADN donde compite por la posición de las protaminas en caso de encontrarse ausentes.

En los resultados mostrados en la Figura 3 existe una tendencia similar entre los valores evaluados por AA y por CMA₃, sin embargo se observa que los valores del conteo bajo microscopio de epifluorescencia (CMA₃) tienden a estar levemente por encima posiblemente por errores sistemáticos dentro del proceso de medición, a pesar de esto se obtuvo un coeficiente de relación de Pearson y un coeficiente de determinación altos (Figura 4), lo que demuestra que independientemente de esta tendencia superior en una de las técnicas ambas se corresponden fuertemente entre sí.

La Criopreservación y su impacto en los gametos masculinos

La base teórica sobre la crio injuria establece que la formación de cristales de hielo es la responsable del impacto de la técnica, incluso al grado de dañar la estructura intracelular del espermatozoide (Muldrew, 1990; Centola, 1992; Morris, 2011). El proceso de congelación y descongelación puede intervenir también en las membranas acrosómicas y mitocondriales lo que podría afectar al espermatozoide en su facultad fecundante (Bell *et al.*, 1993). Otros estudios demuestran su correlación con la aparición de marcadores de apoptosis y peroxidación lipídica por

estrés oxidativo (Said *et al*, 2010) alterando consecuentemente la integridad nuclear. Actualmente ha habido una mejoría en los procedimientos, que incluyen tiempos ajustados a rampas de temperatura e innovación de criopreservantes para evitar el daño y disminuir la formación de estos cristales, como es el caso de la vitrificación de células y embriones, sin embargo en el caso de los espermatozoides se sigue prefiriendo la criopreservación (Morris, 2011).

El método de congelación con el uso del criopreservante con yema de huevo (del inglés *TEST-yolk buffer*) empleado en este análisis se basó en la deshidratación de las células a velocidades lentas de congelación como fueron descritas en la sección de Metodología, previniendo así de algún modo el daño estructural inducido por los cristales de hielo mencionados por Morris en el 2011 y evidenciar si realmente existe un daño significativo en los parámetros básicos y a nivel nuclear.

Análisis de parámetros básicos post congelación

En coincidencia con la literatura (Donnelly, 2001; Aitken, 2010), en nuestro estudio corroboramos que la criopreservación altera no sólo la motilidad y vitalidad de los espermatozoides (Figura 5), sino que a su vez hay evidencia que interviene en la morfología e induce la descondensación de la cromatina espermática (Di Santo *et al.*, 2012). Existen diversos trabajos que sugieren una alteración importante en los niveles de condensación de la cromatina espermática en hombres que consultan por infertilidad comparado con controles de hombres fértiles (Angelopoulou, 2007; Garolla, 2008; Boitrelle, 2012).

Análisis de Integridad Nuclear

La evaluación de la fragmentación del ADN espermático surge como alternativa para explicar las causas que podrían estar relacionadas al factor masculino encubierto o *no evidente* muchas veces de origen desconocido (Aitken, 2010). El impacto de la congelación y esta importante variable fue de especial interés en nuestro estudio (Zribi, 2010; Morris, 2011; Boitrelle, 2012). En nuestro análisis se encontró que existen diferencias significativas entre el porcentaje de fragmentación original y la fragmentación de ADN después de someter las muestras a congelación (Tabla 6).

Aunque existen estudios que sugieren que la integridad del ADN espermático no varía durante el proceso de criopreservación (Watson, 2000; Duru, 2001; Isachenko *et al*, 2004; Isachenko, 2011), nuestro estudio presenta evidencia sobre el impacto negativo a nivel nuclear (Figura 7). Estos resultados concuerdan con los trabajos de Paula *et al*, 2006; Frainais *et al*, 2010 y Zribi *et al*, 2010. A diferencia de los trabajos citados, nuestra población de estudio fueron hombres que no consultan por infertilidad y que dadas sus características seminales son considerados sanos y posiblemente fértiles. Duru y cols. en el 2001 son uno de los grupos que afirman que no existe daño en la integridad nuclear post criopreservación y afirman que el impacto producido por la técnica ocurre directamente en la membrana celular donde se externaliza la fosfatidilserina de las células, sin embargo en su estudio hacen referencia a los espermatozoides que han sido seleccionados por el gradiente de separación Percoll previamente a la congelación. Por otro lado, Donnelly y cols. en el 2001 realizó el análisis de fragmentación comparando los resultados de hombres fértiles contra un grupo de pacientes infértiles. A diferencia nuestra también

realizaron una separación espermática previa a la congelación por gradientes, en este caso encuentran que únicamente los espermatozoides de hombres que consultan por infertilidad presentaban un aumento significativo de la fragmentación nuclear.

En la metodología de nuestro estudio se utilizó toda la muestra proveniente del eyaculado del candidato a ser donante sin ningún tipo de selección espermática inicial, es decir que todo tipo de célula germinal independientemente su estado fue sometida a congelación, lo que sugiere que dependiendo de si existe un método de selección previo a la congelación los resultados del impacto de la técnica a nivel nuclear pueden variar.

Integridad nuclear y capacitación espermática (Post-congelación)

Luego de la descongelación, observamos que el porcentaje de fragmentación del ADN se incrementa significativamente comparado con la fragmentación original (pre congelación) (Tabla 6). Para identificar si existen diferencias entre los valores de fragmentación nuclear entre la *Muestra Total* (post congelación) y la alícuota de la misma muestra (descongelada) pero sometida al gradiente de selección se realizó una comparación de medias de los %TUNEL en donde se evidencia una leve aunque significativa reducción en el porcentaje de fragmentación nuclear luego del gradiente (Tabla 7), destacando la importancia clínica de una correcta selección espermática.

Con el fin de lograr una aproximación del porcentaje de fragmentación existente en el conjunto de espermatozoides vivos, todos los valores de

fragmentación han sido corregidos por el porcentaje de vitalidad obtenida en cada ensayo. En la Tabla 8 se presentan los valores del %TUNEL corregidos, sin embargo hay que aclarar que la corrección de valores es el producto del porcentaje de fragmentación por el porcentaje de vitalidad, por lo tanto los dos primeros análisis arrojan un valor <<menor>> de fragmentación (Tabla 8), en el caso del %TUNEL previo a congelación es debido a que las muestras presentan un valor menor de fragmentación y en la *Muestra Total* (post congelación) al haberse disminuido drásticamente el porcentaje de vitalidad. Luego de la utilización del gradiente ISOLATE® se elimina gran cantidad de espermatozoides muertos que posiblemente presenten su ADN fragmentado, dando como resultado un aumento en el porcentaje de vitalidad, sin embargo el porcentaje de fragmentación en este caso sigue siendo alto (Tabla 6) y por ende el valor obtenido de la corrección es levemente superior a los demás.

Es habitual que en la clínica y procedimientos de reproducción asistida se lleve a cabo algún tipo de selección y capacitación espermática luego de la descongelación de la muestra para posteriormente proceder con la inseminación o procedimiento de fertilización (Drobnis, EZ *et al.*, 1991, Sharma R. *et al.*, 2015). En este caso al realizar el gradiente no solo se están excluyendo espermatozoides muertos sino también aquellos que se encuentran inmóviles o con un grado de motilidad in situ (Akl, *et al* 2011). En nuestro estudio, el valor ajustado de la media del %TUNEL por la vitalidad después de la selección espermática (post congelación) fue del 25,12% (Tabla 8). Teniendo en cuenta que el porcentaje de fragmentación nuclear sugerido por Sergerie y cols. en el 2005 debe ser inferior al 20%, este nuevo

valor de la fragmentación de ADN corregido por la vitalidad espermática representa una mayor aproximación al límite establecido para ser considerado normal.

Es importante resaltar que aunque el porcentaje de fragmentación del ADN espermático disminuye significativamente luego de la selección espermática de cada muestra, todavía pueden haber espermatozoides que contienen su ADN fragmentado o presentan defectos en la condensación de su cromatina (Bungum, 2004; Oliva, 2006; Zribi, 2010) y pueden llegar a ser seleccionados durante una fertilización in vitro. En el 2012, Boitrelle y cols. analizaron espermatozoides móviles post descongelación y encontraron que su integridad nuclear era muy pobre debido a la injuria de la técnica. Los autores concluyen que el daño muchas veces no es letal pero sí sub-letal, con lo cual se sugiere el implemento de otros métodos selectivos como la microscopia de alta resolución (MSOME) luego de la descongelación y capacitación espermática. Otra alternativa propuesta son las columnas de anexina que permitirán la selección de espermatozoides apoptóticos al momento del procedimiento de alta complejidad (Paasch, U. *et al.*, 2005; Said, *et al.*, 2005; Grunewald, S. *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

Mediante el presente estudio logramos cumplir y abarcar el análisis de todos los objetivos planteados en el proyecto de investigación:

- Este estudio presenta evidencia que la criopreservación de semen además de generar una disminución en las características seminales de hombres jóvenes y sanos que **no** consultan por infertilidad también tiene un efecto deletéreo en la integridad nuclear de sus gametos.
- En espermogramas catalogados como normales (OMS, 2010) no se puede establecer algún parámetro seminal como posible predictor de la fragmentación nuclear sugiriendo que el examen de integridad del material genético debe ser evaluado de manera **independiente**.
- Se demostró que aunque la compactación de la cromatina espermática es una gran estrategia celular para proteger al ADN existen casos con altos niveles de fragmentación inicial. De igual forma, una correcta compactación inicial no es garantía para que su integridad nuclear no se vea alterada por la criopreservación de la muestra.
- Se logró evidenciar la importancia clínica que tiene una correcta selección espermática posterior a la criopreservación, disminuyendo significativamente el porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN a valores cercanos a los considerados como normales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abad M, DJ Sprecher, P Ross,. Effect of Sperm Cryopreservation and Supplementing Semen Doses with Seminal Plasma on the Establishment of a Sperm Reservoir in Gilt. *Reprod Dom Anim.* 2007 42: 149-152.
2. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 1999; 284:696–704.
3. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003;79:829-43
4. Ainsworth, Claire. *Cell biology: The secret life of sperm.* Nature. 2005
5. Aitken R, Clarkson J, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989; 41(1):183-97.
6. Aitken R, De Luliis G, Finnie J, Hedges A, McLachlan R. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction.* 2010; 25(10):2415-2426.
7. Akl, L, Bastista J, Mauri A. Petersen C., Efficacy of the motile sperm organelle morphology examination (MSOME) in predicting pregnancy after intrauterine insemination. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 9: 120
8. Alvarez J. *Clinical applications of the study of DNA fragmentation in sperm.* Harvard Medical School. Boston. Estados Unidos. *Andrologia.* 2007.
9. Álvarez Sedó C, Huriondo H, Gil V, Frazer P, Serna J, Nodar F. Niveles de correlación entre la externalización de fosfatidilserina y apoptosis espermática en pacientes con infertilidad masculina. *Reproducción.* 2011; 26(1):32
10. Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2007; 5(36): 1-36.
11. Aitken R, De Luliis G, Finnie J, Hedges A, McLachlan R. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction.* 2010; 25(10):2415-2426.
12. Aitken R, Curry B. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 14(3):367-81.
13. Amor D, Halliday J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Human Reproduction.* 2008; 23(12): 2826-2834
14. AMM. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. World Medical Association. 1964
15. Androl J. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *Journal of Andrology.* 2006; 27(1):112-20
16. Aoki W, Moskovtsev S, Willis J, Liu L, Mullen B, Carrell D. DNA Integrity Is Compromised in Protamine-Deficient Human Sperm. *Journal of Andrology.* 2005; 26(6):741-747

17. Ardón F, Helms D, Sahin E, Bollwein H, Topfer-Petersen E, Waberski D, Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo. *Reproduction*. 2008; 135, 461–470.
18. Atkins D, Best D, Briss PA, Eccles M, Falck-Ytter Y, Flottorp S, et al. Grading quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ*. 2004;328(7454):1490
19. Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune J. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl*. 1990; 13(6):452-62.
20. Balhorn R, A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*. 1982; 93: 298–305.
21. Balhorn R, Cosman M, Thornton K. Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In *The male gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. Cache River Press. 1999; 55-70.
22. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2000;15:1338-44.
23. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod*. 2005;20:185-190
24. Bell M, Wang R, Hellstrom WJG. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J Androl*. 2003;14:472-478
25. Bianchi P, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod*. 1993; 49(5): 1083-8
26. Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergere M, Vialard F, Wainer R, Bailly M, Selva J. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *J Androl*. 2012; 33(6):1371-8
27. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004, 19:1401-1408
28. Braun R. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet*. 2001; 28(1):10-
29. Cabral, N. Integridad cromatinica y su relacion con el daño del AND espermatico en pacientes infertiles: Implicancias clinicas". Tesis de Grado. Universidad de Misiones. 2012
30. Calamera JC, Buffone MG, Doncel GF, et al. "Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa". *Fertil. Steril*. 93 (3): 789–794.
31. Carrell D, Emery B, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction Update*. 2007; 13(3): 313-327.
32. Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak M, Pilch D. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*. 2003; 5(7):675-9
33. Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH. Cryopreservation of human semen: comparison of cryopreservatives, sources of viability and prediction of post-thaw survival. *J Androl* 1992; 13:283-8

34. Cooper TG et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*. (Advanced Acces . 2009
35. Cortez-Gutierrez E, Davila-Rodriguez M, Lopez-Fernandez J, Fernandez J, Gosalvez J. Evaluación del daño del ADN espermático. *Actas Urológicas Españolas*. 2007;31(2):120-131.
36. Cox G, Burger J, Lip V, Mau U, Sperling K, Wu B & Horsthemke B. Intracytoplasmatic sperm inyección may increase the risk of imprinting defects. *Journal Human Genetic*. 2002.
37. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. Effects of holding procedure and seeding on motility, fertilizability, and acrosome reaction. *Fertil Steril*. 1987;47:656–663.
38. Dadoune J, Msayyax M, Guihard–Moscato M. Correlation between defects in cromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrología* 1998; 20:211- 217.
39. De Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril*. 2006; 86:597–600.
40. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1191–9.
41. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol*. 2012; 834-837.
42. Drobniš EZ, Zhong CQ, Overstreet JW. Separation of cryopreserved human semen using Sephadex columns, washing, or Percoll gradients. *J Anrolo*. 1991;12(3):201-8
43. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreserva-tion-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl*. 2001; 22:646–651.
44. Eliasson R. Basic semen analysis en *Current topics in andrology* ed. P. Matson. Paj 2003;34-80.
45. Evenson DP, Larson L, Jost L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*. 1994; 41:637–651.
46. Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah S, Celeste A, Romanienko P, Camerini-Otero R, Bonner W, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell*. 2003; 4(4):497-508.
47. Fernandez-GonzalezR, Moreira P, Perez-Crespo M, Sanchez-Martin M, Ramirez M, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Álvarez P, Hourcade J, Fonseca F. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008; 78:761–772.
48. Frainais C, Vialard F. Impact of freezing/thawing technique on sperm DNA integrity. *Assit Repro Genet*. 2010;27:415-421
49. Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A, Sperm chromatin. *Arch Androl*. 2000; 45: 215–225.
50. Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spano` M, Dondero F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell Tissue Banking*. 2006;7:91–98.

51. Garolla A, ForTini D. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:610-6.
52. Geneser F. *Histología*. Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición. 2006; 638-662
53. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Cap. 19. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
54. Grunewald S, Paasch U, Said TM. Magnetic-activated cell sorting before cryopreservation preserves mitochondrial integrity in human spermatozoa. *Cell Tissue Bank*. 2006;7(2):99-104
55. Hallark J, Sharman RK, Wellstead C. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. *Int J Fertil Womens Med*. 2000;45:38-42.
56. Hammadeh M, Zeginiadev T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl*. 2001; 46:99-104.
57. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger T. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*. 2004, 81:965-972.
58. Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod*. 1991;6(7):979-82.
59. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapour: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol Reprod* 2004; 71:1167-73.
60. Isachenko V, Maettner R, Petrunikina AM, Mallmann P, Rahimi G, Sterzik K, Sanchez R, Risopatron J, Damjanoski I, Isachenko E. Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large volume: a novel technology. *Clin Lab*. 2011;57: 643-650.
61. Jeyedran R, Van der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, Zaneveld J. Development as an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984;70:219-228.
62. Keel BA, Webster BW, Roberts DK. Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1987; 81:213-220.
63. Kvist U. Sperm nuclear chromatin decondensation ability. *Acta Physiol. Scan Suppl* 1980;486:1-24.
64. Lee CY, Lee CT, Wu CH, Hsu CS, Hsu MI. Kruger strict morphology and post-thaw progressive motility in cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia*. 2012;44(suppl 1):81-86.
65. Lindgren BR, Wielinski CL, Finkelstein SM, Warwick WJ. Contrasting clinical and statistical significance within the research setting. *Pediatr Pulmonol*. 1993;16(6):336-40
66. Lopes S, Sun J, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69:528-32.
67. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in men fertility. *Human Reproduction*. 2005; 20(12): 3446-51

68. Manicardi G, Bianchi P, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A₃ accessibility. *Biol Reprod.* 1995; 52(4): 864-7.
69. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction.* 2010; 139: 287-301.
70. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod.* 2004;19:129-38
71. Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl.* 2002; 25: 255–261
72. Morris J, Acton A, Fonseca F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology.* 2011; 64:71-80
73. Muldrew K, Mc Gann LE. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J* 1990;57:525–32
74. Munuce, M. El laboratorio andrológico en la evaluación del factor masculino. *ReproLab-Sanatorio Británico de Rosario. Universidad Nacional de Rosario. Reproduccion* 2008;23:120-128
75. Nasr-Esfahani M. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. *Reproductive Biomedicine Online.* 2007;14(4): 422-429.
76. O'Connell M, McClure N, Lewis SE. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod.* 2002;17:704–709.
77. Oehninger S, Duru NK, Srisombut C, Morshedi M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;169:3–10.
78. Oliva R. Protamine and male infertility. *Human Reproducción Update.* 2006; 12(4): 417-435.
79. Paasch U, Grunewald S, Wuendrich K. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian J Androl.* 2005; 7(1):61-9
80. Paull T, Rogakou E, Yamazaki V, Kirchgessner C, Gellert M, Bonner W. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biol.* 2000; 10(15):886-95.
81. Perez-Crespo M, Moreira P, Pintado B, Gutierrez-Adan A. Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice. *J Androl* 2008; 29:47-54.
82. Regalado P. Como es la captación de donantes en un banco de semen?. *REPROBANK™ Argentina.* Online 2015.
83. Rodriguez-Martinez H, Ekstedt S, Einarsson. Acidification of the epididymal fluid in the boar. *Int J Androl.* 1990 13:238-243
84. Rybar R, Kopecka V., Prinosilova, P. Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia.* 2011; 43:286-291
85. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi G. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7(4):428-32.
86. Sakkas D, Álvarez J. Sperm DNA fragmentation: mechanism of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility.* 2009.

87. Said TM, Grunewald S, Paasch U. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertil Steril*. 2005 May;83(5):1442-6.
88. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online*. 2010;21:456-462.
89. Sangrador, O. Importancia Clinica o Significancia Estadistica. *Evidencias en Pediatría*. 2010; 6:40
90. Shaman A, Yamauchi Y, Ward S. Function of the sperm nuclear matrix. *Journal of Reproduction Systems*. 2007; 53:135-140.
91. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med*. 2015; 61(1):1-12.
92. Sun J, Jurisicova A, Casper R. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1997; 56:602-7.
93. Thomson LK, Fleming SD, Barone K, Zieschang JA, Clark AM. The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* . 2010; 93: 1147-1156
94. Tejada, A. Manejo del paciente estéril en consultorio. *Factor Masculino. Per Ginecol Obstet*. 2006; 52:114-117
95. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC. Interrelationship between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001; 16:2160-2165
96. Trottman M, Becker AJ, Stadler T, Straub J, Slijanik I, Schlenker B. Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *Eur Urol* 2007; 52:355-67.
97. Vadnais M, RN Kirkwood, RJ Tempelman, DJ Sprecher, K Chou. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim Reprod Sc*. 2005 87: 121-32.
98. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil. Steril*. 2010;93 6:1921-8
99. Wang, J. *Untangling the Double Helix. DNA Entanglement and the Action of the DNA Topoisomerases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2009. 245
100. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;2:481-92.
101. Watson, P. Thurston, L. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?. *Cryoletters* 2002; 23:255-262
102. Wellis D, Bermudez MG, Stehuerwald N. Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Human Reprod* 2005; 20:1339-1348
103. OMS. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press. 2010.
104. Yamauchi Y, Shaman JA, Ward WS. Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J Androl*. 2011; 13:31-35. 61(5):902-910.

105. Yovich J, Edirisinghe W, y Yovich J. Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double blind, randomized controlled study. *Fertil Steril* 1994;61(5):902-910.
106. Zini A, Boman J, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2008; 23(12):2663-8.
107. Zribi, N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril.* 2010; 93(1):159-66