

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación del tiempo máximo de incubación de muestras de semen, durante su procesamiento en tratamientos de reproducción asistida, como prueba piloto.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Daniela Sofía Aparicio Quiñonez para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2017

Determinación del tiempo máximo de incubación de muestras de semen, durante su procesamiento en tratamientos de reproducción asistida, como prueba piloto.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación del tiempo máximo de incubación de muestras de semen, durante su procesamiento en tratamientos de reproducción asistida, como prueba piloto.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Daniela Sofía Aparicio Quiñonez para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología


Guatemala
diciembre, 2017


Vo. Bo. :

(f) 
Lic. Fredy Mejía

Tribunal Examinador: .

(f) 
Lic. Fredy Mejía


(f)
Ph. D. Diego Archila

(f) 
Ph.D. Krisztina Ríos

Fecha de aprobación: Guatemala, 8 de diciembre 2017

PREFACIO

La idea de hacer esta investigación inició con una presentación de las técnicas básicas para el desarrollo de tratamientos de reproducción asistida durante el taller de Bioética, Legislación y Normas de Calidad, impartido por la Dra. Vanessa Granados, en el 2015. Fue ahí donde conocí al que sería mi futuro asesor en este proyecto, el Licenciado Fredy Mejía. Al siguiente año acudí al Centro de Fertilidad Gestar, donde el Licenciado labora desde el 2004 como Director de Laboratorio. Tras algunas formalidades de papeleo, el 8 de febrero del 2016 inicié mis prácticas profesionales, supervisada por él. Durante ese tiempo despertó en mi una curiosidad y fascinación por los tratamientos de reproducción asistida y a raíz de ello iniciaría a pensar en mi trabajo de graduación a finales de junio de ese mismo año.

Definitivamente la realización de este proyecto marcó una diferencia importante en mi vida. Fue un tiempo de mucho crecimiento profesional y personal. Indudablemente esto no hubiera sido posible sino fuese por el apoyo que me brindó mi familia, especialmente mis papás y hermanos. Además del apoyo que me dieron mis amigos. Todos guardan un lugar especial en mi corazón, ustedes saben quiénes son. No puedo dejar de darle infinitas gracias al Lic. Mejía por todo lo aprendido y crecido en este tiempo, porque más que mi asesor fue mi mentor y mi amigo. También agradezco a la Dra. Pamela Pennington por su ayuda y apoyo en este proyecto, por cuestionarme siempre y ayudarme a superar mis límites. También agradezco al Dr. Diego Archila por su asesoramiento y paciencia. Y finalmente agradezco a la Dra. Krisztina Ríos por su apoyo y consejos, por motivarme a siempre dar lo mejor de mí y a ser mejor persona cada día. Usted es un ejemplo de profesional y persona.

A todas las personas que me dijeron que no podía: sí pude.

ÍNDICE

| | Página |
|----------------------------------------------------------------------------|--------|
| LISTA DE CUADROS..... | vii |
| LISTA DE FIGURAS..... | viii |
| RESUMEN..... | x |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| A. Antecedentes..... | 1 |
| 1. Generalidades de tratamientos de reproducción asistida..... | 1 |
| a. Origen..... | 1 |
| b. Procedimiento general..... | 1 |
| c. Espermograma..... | 2 |
| B. Marco teórico..... | 3 |
| 1. Capacitación de espermatozoides..... | 3 |
| 2. Especies reactivas de oxígeno..... | 4 |
| 3. Medición de ROS..... | 9 |
| 4. Neutrófilos..... | 11 |
| 5. Daños al ADN espermático, sus causas y su medición..... | 12 |
| a. Empaquetamiento anormal..... | 14 |
| b. Apoptosis..... | 14 |
| c. Estrés oxidativo..... | 14 |
| d. Principales formas de medición..... | 17 |
| 6. Efectos secundarios del daño al ADN espermático y situación actual..... | 18 |
| C. Justificación..... | 21 |
| D. Objetivos..... | 22 |
| 1. Objetivo general..... | 22 |
| 2. Objetivos específicos..... | 23 |
| II. MÉTODOS..... | 24 |
| 1. Obtención de muestras de semen..... | 25 |
| 2. Procesamiento de muestras de semen..... | 25 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3. Obtención de leucocitos en sangre..... | 25 |
| 4. Medición de ROS en semen..... | 27 |
| 5. Medición de fragmentación de ADN espermático..... | 28 |
| 6. Medición de integridad de ADN espermático..... | 28 |
| 7. Descarte de muestras y suministros..... | 29 |
| 8. Análisis de datos..... | 29 |
| 9. Riesgo – beneficio del estudio..... | 29 |
| III. RESULTADOS..... | 31 |
| A. Estandarización de métodos..... | 31 |
| B. Evaluación de muestras de semen de donantes con metodología estandarizada previamente..... | 40 |
| IV. DISCUSIÓN..... | 50 |
| V. CONCLUSIONES..... | 65 |
| VI. RECOMENDACIONES..... | 66 |
| VIII. LITERATURA CITADA..... | 67 |
| IX. ANEXOS..... | 72 |

LISTA DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Concentraciones promedio aproximadas de leucocitos polimorfonucleares en muestras de sangre periférica..... | 33 |
| 2 | Medición visual de la formación de ROS por coloración de botón celular generado, según la muestra..... | 39 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Apariencia microscópica de espermatozoides teñidos para evaluar su morfología y vitalidad..... | 3 |
| 2. Mecanismo propuesto por Aitken en 1999 (modificado del inglés) para la sobreproducción de ROS a partir de espermatozoides inmaduros..... | 5 |
| 3. Hipótesis del mecanismo de daño por ROS en espermatozoides..... | 7 |
| 4. Mecanismo de oxidación en ácidos grasos poliinsaturados propuesto por Aitken, 1999 (modificado del inglés)..... | 9 |
| 5. Posibles orígenes de malformaciones embrionarias o gestacionales propuestas por Gavrieliouk y Aitken, 2015..... | 16 |
| 6. Diagrama de flujo de la estandarización de procedimientos para análisis de muestras | 24 |
| 7. Diagrama de flujo del análisis de muestras..... | 24 |
| 8. Fases formadas durante la segunda centrifugación para el aislamiento de neutrófilos de sangre periférica..... | 31 |
| 9. Aislamiento de leucocitos en sangre periférica..... | 32 |
| 10. Leucocitos metabólicamente activos en sangre periférica..... | 34 |
| 11. La movilidad progresiva se reduce después de 21 horas de co-cultivo con neutrófilos, medio de cultivo de neutrófilos o sin neutrófilos..... | 35 |
| 12. No hay efectos significativos sobre la vitalidad espermática promedio luego del co-cultivo con neutrófilos extraídos de sangre periférica; comparando con sobrenadante, botón y control..... | 36 |
| 13. Fragmentación de ADN espermático en una muestra desconocida..... | 38 |
| 14. Presencia de ROS en botones celulares, según la muestra..... | 39 |
| 15. Curva de calibración de absorbancia, según la cantidad de formazan..... | 40 |
| 16. Comparación de la cantidad de formazan producido a lo largo del tiempo, según la concentración neutrófila..... | 41 |
| 17. Formación de formazan variando la concentración neutrófila y su relación con el tiempo..... | 42 |

| | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 18. | Formación de formazan con el paso del tiempo y su relación con el mismo..... | 43 |
| 19. | La movilidad progresiva no cambia significativamente con el tiempo, ni hay una diferencia significativa entre las muestras y controles; tampoco existe una tendencia lineal en el tiempo..... | 44 |
| 20. | La vitalidad no cambia significativamente con el tiempo, ni hay una diferencia significativa entre las muestras y controles; pero si existe una tendencia lineal en el tiempo. | 46 |
| 21. | La fragmentación de ADN aumenta significativamente con el tiempo, también hay una diferencia significativa entre las muestras y controles, y si existe una tendencia lineal de aumento en el tiempo..... | 47 |
| 22. | La descompactación cromosómica aumenta significativamente con el tiempo, también hay una diferencia significativa entre las muestras y controles, y si existe una tendencia lineal de aumento en el tiempo..... | 48 |

RESUMEN

Actualmente, al menos seis millones de niños han nacido por tratamientos de reproducción asistida en todo el mundo (ESHRE, 2016). Para el desarrollo de estos tratamientos es necesario el manejo de muestras de semen en un laboratorio donde los espermatozoides son capacitados y seleccionados según los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013). Durante este proceso los espermatozoides son expuestos a especies reactivas de oxígeno del ambiente y a las producidas por leucocitos. Se han reportado casos con una relación directa entre niveles altos de especies reactivas de oxígeno e de infertilidad masculina (Robinson, *et al.* 2012).

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el tiempo máximo de incubación para las muestras de semen, previo a que inicie el daño por oxidación. Se extrajeron leucocitos de muestras de sangre y se cultivaron a diferentes concentraciones con las muestras de semen correspondientes por períodos cortos de incubación. En cada tiempo se cuantificó la concentración de especies reactivas de oxígeno, movilidad progresiva, vitalidad, integridad de ADN y descompactación cromosómica en espermatozoides.

Con ello se determinó el tiempo máximo de incubación de las muestras de semen, para tratamientos de reproducción asistida, previo al daño macro y microscópico causado por la presencia de especies reactivas de oxígeno. Los resultados obtenidos sugieren que las muestras de semen deben procesarse lo más pronto posible, con un tiempo máximo de 30 minutos, luego de su licuefacción para minimizar el daño producido por oxidación. Se considera una prueba piloto exitosa, pero no se recomienda realizar un estudio más grande porque estos resultados ya sugieren una tendencia a pesar de ser una muestra reducida.

I. INTRODUCCIÓN

A. Antecedentes

1. Generalidades de tratamientos de reproducción asistida

a. Origen. La fecundación natural inicia desde el momento en que un espermatozoide penetra un óvulo. Durante una relación sexual, los espermatozoides son depositados en la vagina de la mujer por medio de la eyaculación, desde donde nadan hacia el óvulo para fecundarlo. Sin embargo, aproximadamente 15% de las parejas en edad reproductiva son infértiles, es decir, no logran un embarazo después de un año de estar intentándolo (Bungum, 2011). A raíz de esto, a mediados de los años setentas nació el primer “bebé probeta”, Louise Brown, por medio de la fecundación *in vitro* (Bungum, 2011). Según la ESHRE - European Society of Human Reproduction and Embryology -actualmente existen por lo menos 6 millones de niños, a nivel mundial, nacidos por estos procedimientos (ESHRE, 2016).

b. Procedimiento general. Se define como técnica de reproducción asistida (TRA) a cualquier tratamiento que involucra el manejo de gametos o embriones fuera del cuerpo; los tres principales son la inseminación artificial, la fecundación *in vitro* (FIV), y la inyección intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI, por sus siglas en inglés) (NHMRC Ethical guidelines on assisted reproductive technology, 1996). El primero se considera un tratamiento de baja complejidad, mientras que los últimos dos se consideran tratamientos de alta complejidad. Esta diferencia se establece porque en una inseminación artificial la fecundación si es intra corporal, mientras que en una FIV o ICSI, la fecundación es *in vitro*. En todos los casos, el tratamiento inicia con la obtención de una muestra de semen, ya sea por masturbación, por coito interrumpido o por biopsia testicular. Esta muestra es procesada en el laboratorio donde los espermatozoides son capacitados y evaluados según los parámetros oficiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013). En el caso de las inseminaciones artificiales se prosigue a depositarlos dentro de la cavidad uterina de la mujer y se espera una fecundación interna. Mientras que en los tratamientos de alta complejidad es necesaria la obtención de óvulos por medio de una punción folicular, que luego se cultivan en condiciones controladas. Posteriormente, en las FIV se depositan pequeños volúmenes de la muestra de semen procesada junto con los óvulos extraídos, para facilitar la fecundación.

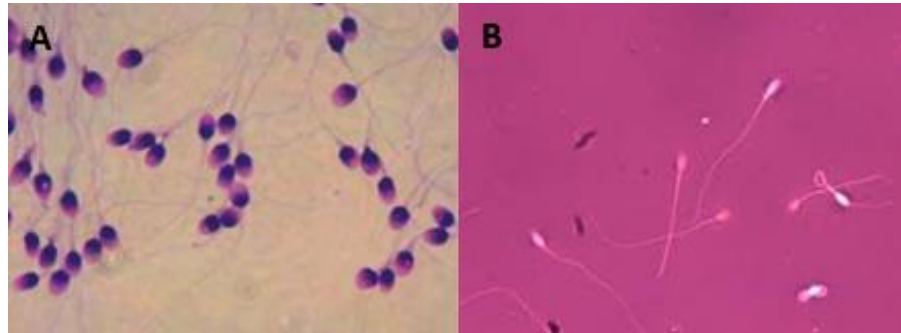
En ICSI, los espermatozoides se inyectan directamente dentro del óvulo. En ambos casos, los embriones generados se cultivan de 3 a 6 días, y vitrifican o transfieren al útero de la mujer, esperando su implantación (Gardner, *et al.* 2008).

c. Espermograma. Como se mencionaba antes, el procesamiento de semen en el laboratorio inicia con la evaluación del eyaculado. Esta evaluación se conoce como espermograma (OMS, 2013). En esta primero se evalúa la muestra a nivel macroscópico incluyendo el color, la apariencia, la viscosidad, la presencia/ausencia de geles, y el nivel de licuefacción. Esta última se da luego de una incubación a 37°C con una duración aproximada de 15 a 30 minutos, pero es un tiempo indefinido y puede variar mucho según la muestra. Esta incubación es necesaria debido a la presencia de seminogelinas en el eyaculado fresco que dificultan su evaluación y procesamiento porque le dan una consistencia espesa y gelatinosa, difícil de observar en un microscopio. Al entrar en contacto con el ambiente, las seminogelinas se licúan y resulta en un semen más homogéneo, menos viscoso y más fácil de evaluar (Lipshultz, *et al.* 2009). Una vez alcanzada la licuefacción completa, se prosigue con el cálculo de concentración espermática, la clasificación del tipo de movilidad, la vitalidad y la morfología de aproximadamente 200 espermatozoides. Se reportan porcentajes y valores promedio. En la Figura 1A se puede observar una imagen microscópica de espermatozoides teñidos con eosina-Azure A para la evaluación de su morfología. En la 1B se observan espermatozoides teñidos con eosina para evaluar su morfología.

Un paciente se diagnostica con azoospermia cuando no se encuentran espermatozoides, criptoospermia cuando hay menos de 100,000 espermatozoides por mililitro; oligozoospermia cuando hay menos de 5 a 10 millones, astenoospermia cuando hay muy baja motilidad, y teratoospermia cuando la morfología está muy alterada (OMS, 2013). Una variedad de autores ha reportado que pacientes con este tipo de diagnósticos tienen hasta un 43% de espermatozoides con ADN dañado (Shamsi, *et al.* 2011; Edmund, *et al.* 2014; Aitken, 1992; Athayde, *et al.* 2007), y resaltan el problema de que un espermograma tradicional no incluye análisis genético por lo que recomiendan incluirlo.

Figura 1. Apariencia de espermatozoides al evaluar su morfología y vitalidad.

A, Apariencia microscópica de espermatozoides teñidos con eosina-Azure A para evaluar su morfología. Magnificación 1,000X. **B.** Espermatozoides teñidos con eosina para evaluar su vitalidad. Magnificación 400X



(OMS, 2013)

B. Marco teórico

1. Capacitación de espermatozoides. Al concluir con el espermograma, los espermatozoides son seleccionados para aislar a los que tienen mejor movilidad y capacitarlos para que puedan fecundar al óvulo. Solo los más capaces serán utilizados para el tratamiento de reproducción asistida (Athayde, *et al.* 2007). Existen dos procedimientos comúnmente usados para seleccionarlos: por *swim-up* o por gradientes de densidad. El *swim-up* consiste en la centrifugación de la muestra total de semen, con el mismo volumen de medio. Luego de ello se agrega 1 mL de cultivo a la pastilla que queda al fondo, y se deja en incubación a 37 °C, durante media hora. En este tiempo, solo los mejores espermatozoides nadarán a la superficie del medio y serán colectados para su uso posterior. En el caso del tratamiento con gradientes de densidad, son necesarias soluciones al 40 % y 80 % de medio de cultivo especial. Se coloca el equivalente al volumen de la muestra en un tubo cónico en el siguiente orden: 80 %, 40 %, muestra total de semen. Todo esto se centrifuga y la pastilla colectada al fondo es trasvasada y pasada por un lavado más con medio y centrifugación, para su posterior uso (OMS, 2013) en el tratamiento que corresponda. Por medio de este procedimiento se remueven todas las células contaminantes, células del sistema inmune, plasma, seminogelias restantes, y espermatozoides inmaduros o con malformaciones;

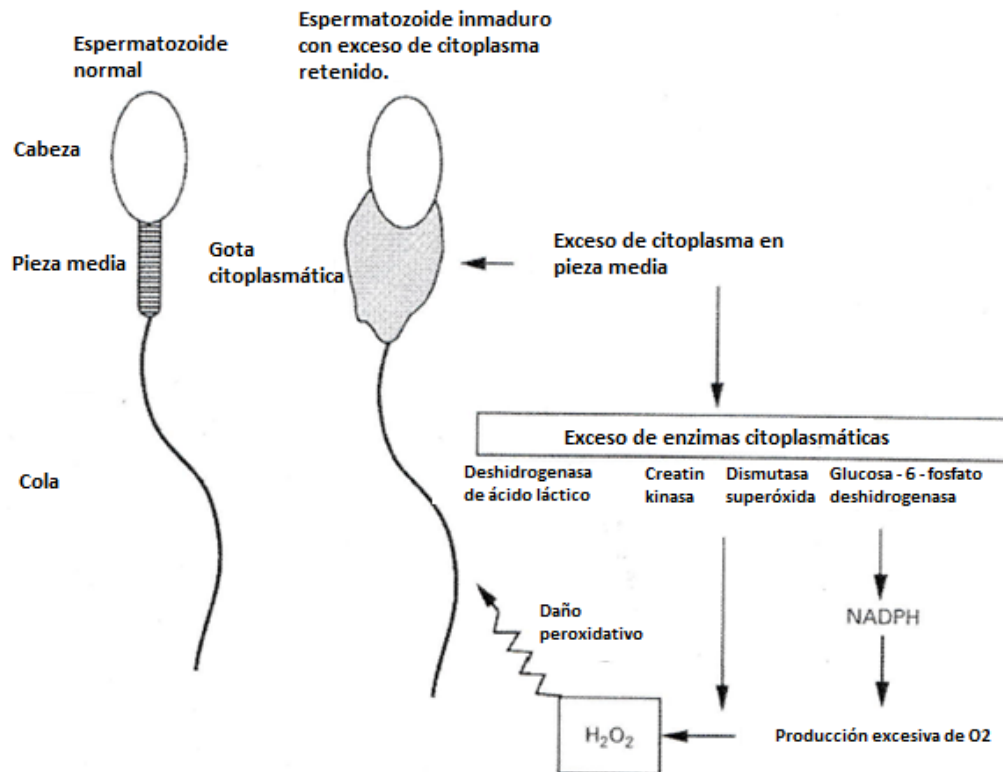
seleccionando solo a los más competentes y con mayor capacidad fecundativa (Athayde, *et al.* 2007).

2. Especies reactivas de oxígeno. Los ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés), son sub productos normales de las reacciones metabólicas de cualquier célula, incluyendo los espermatozoides. La principal forma de ROS ocurre con la adición de un electrón extra al oxígeno, resultando en un superóxido aniónico radical. Este se convierte luego en más tipos de ROS, incluyendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxy ($HO_2\cdot$). Son inestables y reaccionan con aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos (Edmund, *et al.* 2014; Vernet, *et al.* 2001). En el espermatozoide humano, los ROS son generados a partir de dos vías principales: nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) oxidasa en la membrana plasmática y por la nicotinamida adenina dinucleotido (NADH) óxido reductasa en el sistema mitocondrial (Lipshultz, *et al.* 2009; Vernet, *et al.* 2001). Una concentración baja de ROS es necesaria para la maduración y capacitación normal de los espermatozoides ya que induce cambios en la membrana espermática. Su membrana sufre cambios en la distribución de sus ácidos grasos, en glicosilación, y en la razón colesterol: fosfolípido. Cuando estos procesos no ocurren correctamente, los espermatozoides pierden su capacidad fecundante y no responden biológicamente a los atrayentes ovulatorios, como la progesterona (Vernet, *et al.* 2001).

Los ROS se pueden producir por fugas de electrones en la cadena de oxidación mitocondrial, generando NADPH oxidasa y óxido nítrico ($NO\cdot$). Se sabe que el $NO\cdot$ tiene efectos citotóxicos, pero se cree que es un mediador de la función del espermatozoide (Cavagna, *et al.* 2012). Se ha determinado que el nivel de ROS en semen incrementa cuando los espermatozoides se cultivan en el mismo medio con neutrófilos, espermatozoides inmaduros o metales pesados (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Aitken, *et al.* 1992). Los mayores productores de ROS en el semen son espermatozoides inmaduros o leucocitos (Bungum, 2011; Aitken, 1999; Agarwal, *et al.* 2014). Los espermatozoides inmaduros se caracterizan por tener citoplasma residual contenido en la parte media de su cola; lo cual resulta en más actividad de la glucosa-6-fosfato des-hidrogenasa y lleva a una generación excesiva de NADPH y por lo tanto también de ROS (Aitken, 1999).

En la Figura 2 se puede observar el mecanismo propuesto por Aitken en 1999 para la sobreproducción de ROS en espermatozoides inmaduros. Inicia con el exceso de citoplasma que no se ha podido eliminar en el proceso de maduración por lo que se acumula en el cuello. Por tanto, también se acumula exceso de enzimas citoplasmáticas en ello. Algunos ejemplos de estas enzimas son la ácido láctico deshidrogenasa, creatinina quinasa, superóxido dismutasa, o la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. Estas producen exceso de NADPH, que genera exceso de oxígeno diatómico y a su vez genera peróxido de hidrógeno. Este último es el compuesto que finalmente genera daño peroxidativo al espermatozoide.

Figura 2. Mecanismo propuesto por Aitken en 1999 (modificado del inglés) para la sobreproducción de ROS a partir de espermatozoides inmaduros.

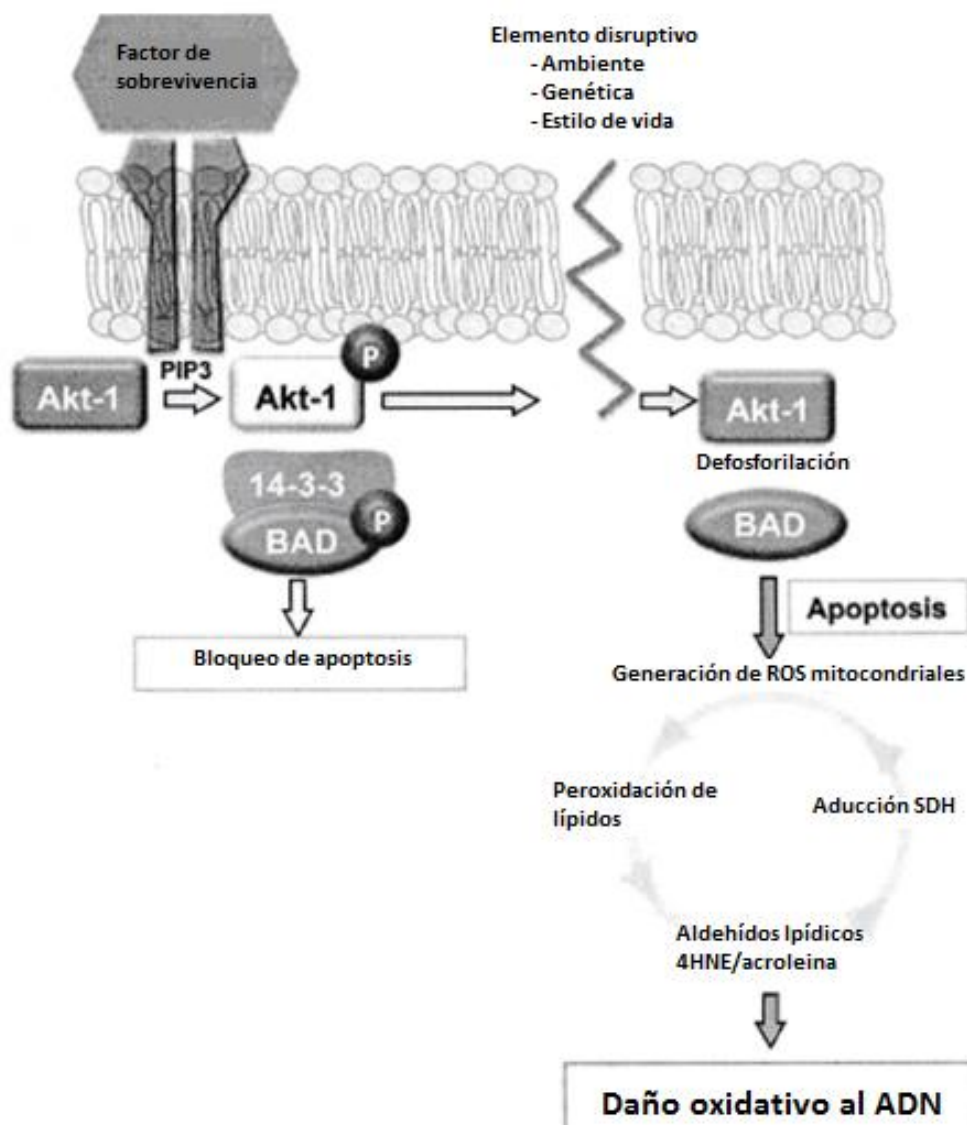


Un exceso en la producción de ROS genera un ciclo vicioso que no termina hasta que ocasiona muerte celular. Aitken y sus colaboradores propusieron en el 2013 una hipótesis del mecanismo de oxidación que sufren los espermatozoides. En ella explican cómo los espermatozoides que están expuestos a un exceso de ROS se ligan a una cascada de reacciones que finalmente llevan a la apoptosis. Todo comienza con el desencadenamiento de una mayor producción de ROS por una fuga de la mitocondria y culmina en la fragmentación del ADN y muerte celular.

Mencionan que el inicio del ciclo podría deberse al fallo en la capacidad antioxidante del espermatozoide, calor o radiofrecuencias o anormalidades morfológicas. También resaltan que existe la vía de fosforilación de PI3 que mantiene a los espermatozoides vivos porque previene que entren en un estado apoptótico. La inhibición de esta vía resulta en una rápida pérdida de motilidad, generación de ROS mitocondriales, y finalmente daño al ADN por OS (estés oxidativo, por sus siglas en inglés) (Aitken, *et al.* 2013).

Más adelante, Aitken y sus colaboradores proponen un mecanismo más detallado en el 2013 (ver Figura 3) respecto a la vía de generación de daño por ROS en espermatozoides. Inicia con un factor externo que puede ser ambiental, genético, o del estilo de vida del hombre. Esto provoca la desfosforilación de la proteína BAD por la Atk-1 que señala para la vía de apoptosis, lo cual genera ROS mitocondriales e inicia el ciclo de daño oxidativo. Este se comprende por tres pasos básicos de oxidación: aducción SDH, aldehídos lipídicos 4HNE/acroleína, y peroxidación de lípidos; que finalmente culmina en daño permanente al ADN espermático.

Figura 3. Hipótesis del mecanismo de daño por ROS en espermatozoides



(modificado de Aitken, *et al.* 2013).

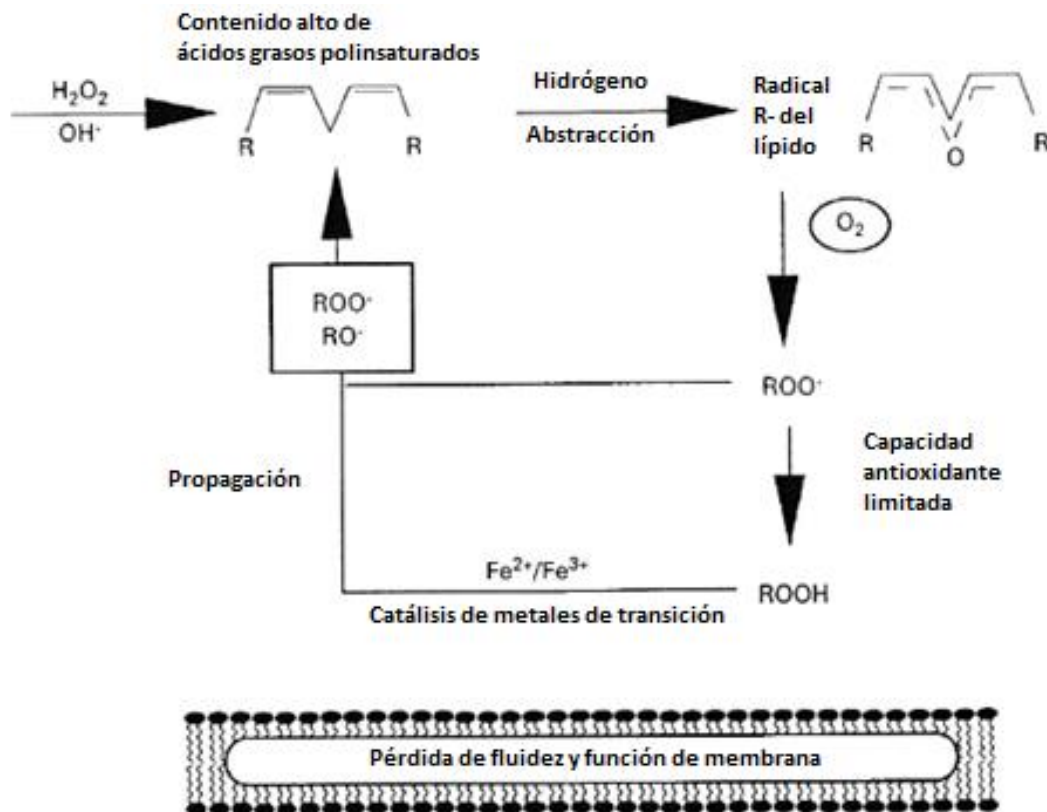
La proximidad del ADN genómico a las mitocondrias, lugar de la producción de ROS intracelulares, lo hace más susceptible a daños por OS, perpetuando el ciclo de daño genómico por especies oxidantes (Shamsi, *et al.* 2011; Aitken y De Iulii, 2009).

Por otra parte, casi inmediatamente después de que el espermatozoide comienza a sufrir estrés oxidativo, los fosfolípidos poliinsaturados – particularmente ácido decosaexaónico con seis enlaces dobles por molécula (Aitken y Roman, 2009) - inician la

cascada de peroxidación que genera aldehídos lipídicos como 4HNE, acroleína y malondialdehído (Edmund, *et al.* 2014; Aitken, *et al.* 2013). Las concentraciones altas de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana son particularmente vulnerables a sufrir por los efectos de los ROS por su abundancia de enlaces dobles. Al ser atacados estos generan radicales lipídicos con un carbono central que luego reaccionan con el oxígeno y generan ROO• y RO•, que para lograr estabilizarse remueven hidrógenos vecinales y perpetúan el ciclo, asegurando el daño progresivo a lo largo de toda la población espermática (Aitken y Roman, 2009; Aitken, 1992). La sobreabundancia de estos también estimula la producción de ROS mitocondriales que desencadenarán una respuesta apoptótica por un estado de estrés oxidativo severo (Gavriliouk y Aitken, 2015). Las mayores víctimas de estos agentes oxidantes resultan ser proteínas de membrana mitocondrial, lo cual lleva a la formación de un anión superóxido que activará la cascada de apoptosis. Por lo tanto, el daño no ocurre sólo al ADN sino también a las membranas celulares. Espermatozoides completamente normales, según los parámetros de la OMS, aún podrían llevar en su interior ADN dañado, creando un problema para la selección de espermatozoides en TRAs de alta complejidad. Inclusive si los espermatozoides no presentaran daño en cuanto a integridad o compactación de ADN, puede que carguen con mutaciones epigenéticas que luego se hereden al ADN embrionario (Aitken, *et al.* 2013; Shamsi, *et al.* 2011; Robinson, *et al.* 2012; Aitken y De lullis, 2009).

En 1999 Aitken propone un mecanismo detallado de la vía de oxidación en ácidos grasos de membrana (ver Figura 4). Inicia con la acción de peróxido de hidrógeno con iones hidroxilo sobre los ácidos grasos poliinsaturados. Esto genera un grupo sustituyente con radical libre que libera oxígeno diatómico. Este a su vez produce más radicales libres de ácidos grasos que se catalizan por metales de transición. Finalmente, el ciclo continúa con la interacción de los radicales libres generados con otro ácido graso presente y el ciclo se perpetúa hasta que resulta en la pérdida de fluidez y función de membrana, haciendo al espermatozoide más susceptible a daño por ROS extra celulares.

Figura 4. Mecanismo de oxidación en ácidos grasos poliinsaturados propuesto por Aitken, 1999 (modificado del inglés).



En el 20% de los casos de infertilidad la causa predominante se debe a factores masculinos y en otro 30% se debe tanto a factores masculinos como a factores femeninos (Bungum, 2011; Shulte, *et al.* 2010). Los valores de ROS en semen tienen hasta un 68.8% de sensibilidad y un 93.8% de especificidad para diagnosticar infertilidad debido a factor masculino (Edmund, *et al.* 2014), por lo que sí es un parámetro importante para incluir en los análisis de rutina en un laboratorio de fertilidad.

3. Medición de ROS. Debido a la importancia de los ROS, en las últimas décadas se han desarrollado los siguientes ensayos para evaluar su concentración (Lipshultz, *et al.* 2009):

a. Quimioluminiscencia. Es el método más común para medir la concentración de ROS en semen. La reacción entre los agentes oxidantes y ciertos reactivos específicos producen una emisión de luz que se puede convertir en una señal eléctrica, medible con un

luminómetro. Los principales reactivos utilizados son luminol y lucigenina. El primero produce señales que se correlacionan con la función espermática. En su estado neutral es una molécula que reacciona con los radicales libres que encuentra ya sea extra o intracelularmente. Esto resulta en una desventaja porque no se puede diferenciar entre ambos y además, tiene una vida media muy corta y produce apenas un 2% de rendimiento en los mejores casos. En su estado cargado es relativamente impermeable a la membrana y reacciona con los superóxidos que encuentra extracelularmente. Además, tiene como desventaja que solo mide la concentración total de ROS, pero no da información entre las diferentes contribuciones de espermatozoides inmaduros o leucocitos (Lipshultz, *et al.* 2009).

b. Test de nitro azul tetrazolio (NBT). Es un colorante amarillo, soluble en agua, que reacciona con los superóxidos celulares que forman un derivado del formazan, monitoreable por medio de un espectrofotómetro. El sistema oxidativo de NADPH en el citoplasma reduce el NBT a formazan. Este test puede utilizarse para células individuales, ya sea leucocitos o espermatozoides. Refleja la producción de ROS en el citoplasma celular y ayuda a determinar del lugar de origen específico. Presenta como desventajas que el NBT también puede ser reducido por otras reductasas celulares y no solo los ROS. Es un método rápido, fácil, barato y altamente sensible (Lipshultz, *et al.* 2009). Este test ha demostrado ser útil en la cuantificación tanto de leucocitos como de concentración de ROS (Iommiello, *et al.* 2015).

c. Citometría de flujo. En este método se utilizan sondas fluorescentes, normalmente DCFH-DA, DHE, y dihidrohodamina 123. Estas sondas se difunden dentro de las células y al oxidarse emiten fluorescencia que se puede medir con un citómetro de flujo. Es así como mide tanto la concentración como la razón. También se puede utilizar para diferenciar entre espermatozoides viables y no viables en una muestra de semen por medio del uso de tintes como yoduro de propidio o Yopro-1. Dependiendo de los tipos de sondas que se utilicen, este método puede diferenciar entre todos los tipos de ROS y su ubicación específica dentro de la célula. Tiene como desventajas que es muy costoso y se necesita de un software computacional complicado con un técnico experto (Lipshultz, *et al.* 2009).

Los ROS también se pueden medir por medio de otras técnicas como el test de reducción de citocromo c, la resonancia de electro-spin (ESR, por sus siglas en inglés), resonancia electrónica paramagnética, o el ensayo basado en xilenol-naranja, pero todas estas técnicas no se discutirán en detalle porque no son relevantes para el estudio.

4. Neutrófilos. La presencia de más de un 1 millón de leucocitos por mililitro de muestra se conoce como leucospermia o leucocitospermia (OMS, 2013). Se presenta en un 10-20% de hombres infértiles (Agarwal, *et al.* 2014). Esta patología se puede deber a una infección o inflamación, que atrae células del sistema inmune. Los neutrófilos y los macrófagos constituyen hasta un 95% de los leucocitos seminales (Cavagna, *et al.* 2012). Naturalmente los fagocitos generan radicales libres (Aitken, *et al.* 2013). Esto resulta en una sobre producción de citoquinas, que da lugar a la generación de especies oxidativas (Cavagna, *et al.* 2012; Robinson, *et al.* 2012; Edmund, *et al.* 2014). Los ROS también son generados por espermatozoides inmaduros, pero los leucocitos pueden generar hasta 1,000 veces más que ellos en condiciones fisiológicas (Edmund, *et al.* 2014; Iommiello, *et al.* 2015; Agarwal, *et al.* 2014; Sharma, *et al.* 2001). Iommiello reportó en el 2015 que hay una correlación entre la concentración de leucocitos y el nivel de estrés oxidativo; lo cual confirma que probablemente los ROS sean producidos casi exclusivamente por leucocitos. Además, Agarwal reportó en el 2014 que los niveles de ROS medidos en 472 pacientes aumentaban según aumentaba la concentración de leucocitos en la muestra, sugiriendo una relación directa.

Existe cierta capacidad antioxidante en el semen que logra amortiguar la presencia de ROS, pero cuando esta es sobrepasada los espermatozoides sufren estrés oxidativo (Oliva y Multigner, 2006). Algunos antioxidantes naturales son la dismutasa superóxida, la glutatión transferasa, la peroxidasa, la albúmina, la vitamina C, y el zinc (Aitken, 1999; Edmund, *et al.* 2014). Las células de Leydig están encargadas de producir todo el líquido seminífero el cual de la fluidez al semen y de producir la célula germinal a partir de la cual se forman los espermatozoides. En pacientes con edades más altas estas células dejan de generar suficiente líquido y por lo tanto también suficientes antioxidantes, volviendo a los espermatozoides más susceptibles a daños por ROS (Sharma, *et al.* 2001; Edmund, *et al.* 2014), por lo tanto, la integridad del ADN se ve directamente afectada por ello. Sharma reportó en el 2001 que los

hombres con infertilidad también presentaban menor capacidad amortiguadora en el eyaculado. El estrés oxidativo ocurre cuando la producción de ROS es mayor que la capacidad antioxidante que contenga el eyaculado (Agarwal, *et al.* 2014). Evidentemente, esto resulta en daño celular y genético en el espermatozoide (Iommiello, *et al.* 2015). El daño del ADN puede aumentar también por factores externos como tiempo de incubación excesiva, crio preservación, algunos tipos de cáncer como leucemia, medicamentos invasivos como quimioterapia, remedios herbales como *Ginko biloba*, consumo de cigarrillos, o toxinas culturales (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Shulte, *et al.* 2010; Aitken y De lullis, 2009). Además de un tiempo de incubación excesiva sin suplementación con antioxidantes al medio de cultivo (Gavriliouk y Aitken, 2015).

Se ha encontrado que existen niveles altos de leucocitos en el plasma seminífero de aproximadamente 40% de pacientes con infertilidad (Cavagna, *et al.* 2012; Edmund, *et al.* 2014). Al capacitar a los espermatozoides para TRAs, ya sea por medio de gradientes de densidad o por *swim-up*, el plasma seminal se remueve. Por lo que la capacidad antioxidante del plasma de los espermatozoides es menor y resulta en una exposición total al medio ambiente y mayor vulnerabilidad a daño por ROS (Gavriliouk y Aitken, 2015; Aitken, 1999; Sharma, *et al.* 2001).

5. ADN espermático y su medición. Como mencionan párrafos anteriores, la presencia de un exceso de ROS, producidos por fugas en la mitocondria, espermatozoides inmaduros o neutrófilos, en una muestra de semen puede producir daños severos en el ADN espermático. El índice de fragmentación de ADN (DFI, por sus siglas en inglés) es el más eficiente en predecir la fertilidad de una pareja y su probabilidad de concepción. El grado de fecundación es más alto en muestras que presentan un DFI menor al 10% aproximadamente, dependiendo de la técnica que se utilice para medirlo. Se ha encontrado una correlación negativa del mismo con la concentración de espermatozoides, la motilidad y la morfología (Sharma; *et al.* 2001). Athayde reportó en el 2007 que, de 161 pacientes evaluados, los que presentaban fertilidad tenían concentración espermática y otros parámetros de la OMS significativamente mejores que los que eran infértiles. Por otro lado, Iommiello reportó en el 2015 que, de 56 hombres evaluados, había una diferencia significativa en los niveles de DFI entre los que tenían

concentraciones altas de ROS y los que tenían concentraciones bajas. Los que tenían ROS altos, tenía un DFI alto; y los que tenían ROS más bajos, tenían DFIs más bajos también.

Un DFI alto (30% o más) puede resultar en calidad embrionaria reducida incluso si la transferencia embrionaria es exitosa (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Absalan, *et al.* 2012, Bungum, 2011; Schulte, *et al.* 2010; Shamsi, *et al.* 2011; Gavrioliouk y Aitken, 2015). Típicamente los daños se reparan por los mecanismos moleculares conocidos como BER, NER, DSB, NHEJ, y HR (Gavrioliouk y Aitken, 2015). Un DFI de 30% o más resulta en una probabilidad de embarazo de casi cero, según lo reportado en la literatura (Schulte, *et al.* 2010; Tsarev, *et al.* 2009; Shamsi, *et al.* 2011); mientras que un DFI de 20% o menos resultó en un 13% de embarazos a término. Bungum reportó en el 2011 un DFI entre 20% y 40% en hombres con parámetros tradicionales normales en semen. Actualmente se cree que esta es la explicación que hacía falta en parejas con infertilidad idiopática o con pérdidas gestacionales repetidas (Absalan, *et al.* 2012; Kim, *et al.* 2013; Tsarev, *et al.* 2009; Aitken, *et al.* 2013; Shamsi, *et al.* 2011; Cavagna, *et al.* 2012; Iommiello, *et al.* 2015).

La integridad del ADN espermático está relacionada con la fertilidad masculina en más o menos 50% de los casos (Absalan, *et al.* 2012; Athayde, *et al.* 2007). Se sabe que la calidad de la cromatina contenida en los espermatozoides tiene relación directa con el potencial reproductivo del hombre. Por lo tanto, el ADN anormal puede resultar en sub-fertilidad o en infertilidad masculina (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Oliva y Multigner, 2006), aunque también interfieren otros factores relacionados con la genética, edad del hombre y exposición a radicales libres (Absalan, *et al.* 2012). La diferencia de la cromatina espermática con la cromatina en células somáticas radica en varios factores. Principalmente a que en el espermatozoide está mucho más compactada con el fin de proteger al ADN en su paso por el epidídimo hacia el exterior (Hekmatdoost, *et al.* 2009). De todos los mamíferos, el ADN espermático humano es el menos empaquetado de todos (Shulte, *et al.* 2010), lo cual lo hace más susceptible.

Los mecanismos de daño al ADN no se conocen exactamente, pero existen tres hipótesis principales de sus causas:

a. Empaquetamiento anormal. Como se mencionaba antes, la cromatina espermática está de forma compactada. Durante la formación de los espermatozoides sus histonas son remplazadas por proteínas de transición y luego remplazadas por las proteínas más básicas, P1 y P2 (Kim, *et al.* 2013; Hekmatdoost, *et al.* 2009; Bungum, 2011). Esto neutraliza completamente los enlaces fosfodiéster de la columna de ADN y minimiza la repulsión entre las hebras vecinas (Tsarev, *et al.* 2009). Las protaminas convierten al ADN en una estructura llamada toroide y lo hace muy susceptible a daños por nucleasas y por ROS (Aitken, *et al.* 2013; Gavrioliouk y Aitken, 2015). Luego de esto, los grupos sulfhidrilo son oxidados a enlaces disulfuro para incrementar la compactación (Hekmatdoost, *et al.* 2009). La mayoría de los problemas surgen durante la formación de los enlaces o en el cambio de proteínas (Shulte, *et al.* 2010). La proporción de estas también es fundamental (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Bungum, 2011). Al estar mal empacado, el ADN se vuelve más susceptible al daño por ROS, incrementando su fragmentación (Bungum, 2011; Aitken, *et al.* 2013; Shamsi, *et al.* 2011). Shulte reportó en el 2010 que los hombres infértiles tienen una proporción más alta de histonas-protaminas, en comparación con hombres saludables.

b. Apoptosis. Los espermatozoides que contienen señales de apoptosis son los que presentan daño permanente en el ADN. De manera que este mecanismo es muy importante para regular la producción de espermatozoides de buena calidad (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Shulte, *et al.* 2010). La apoptosis se señala por medio de las proteínas Fas o por la reducción de telómeros. Los parámetros seminales con niveles bajos se asocian con una incidencia alta de proteínas Fas (Shulte, *et al.* 2010). El problema ocurre cuando los espermatozoides no completan el ciclo y se quedan en una fase intermedia entre vivo y apoptótico (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Bungum, 2011). No se conocen factores extrínsecos que vayan a activar confiablemente el mecanismo de apoptosis en espermatozoides por medio de receptores. Los espermatozoides apoptóticos se caracterizan por una pérdida rápida de motilidad, generación de ROS mitocondriales, activación de caspasas en el citosol, vacuolización, y daño por oxidación (Gavrioliouk y Aitken, 2015).

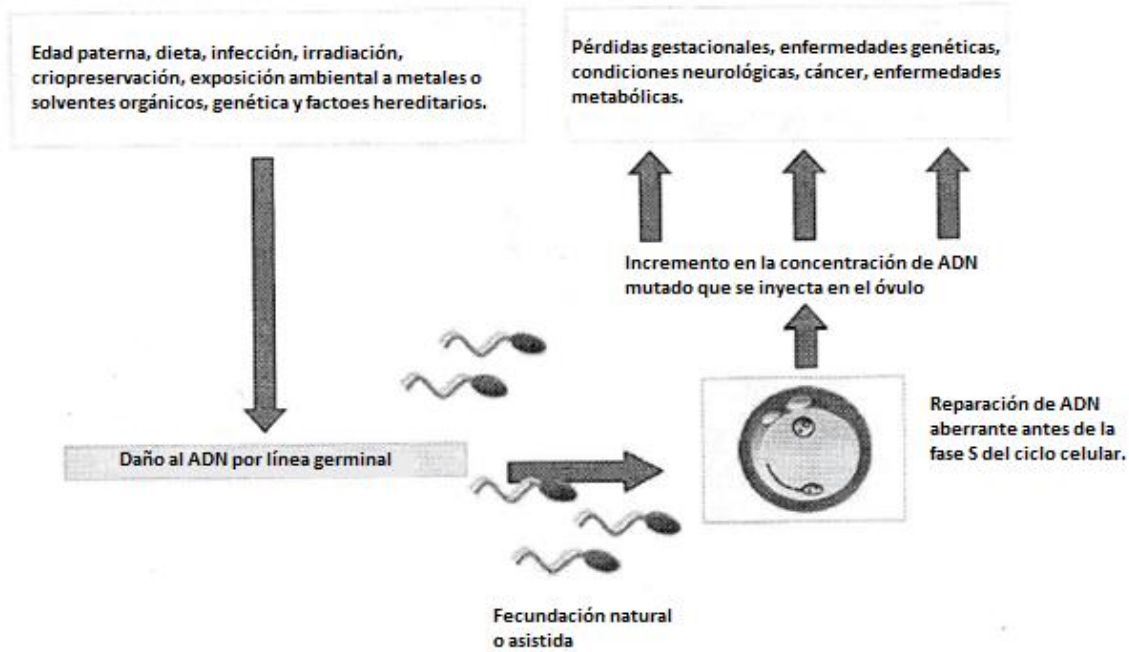
c. Estrés oxidativo (OS, por sus siglas en inglés). El estrés oxidativo es la causa más común de daño al ADN espermático (Aitken, 1999; Sharma, *et al.* 2001) y se define como un desbalance entre la capacidad amortiguadora del plasma seminal y la formación de ROS.

Estos últimos provocan modificaciones o deleciones de bases, enlaces cruzados, re arreglo cromosomal, rupturas de hebra doble o simple, y mutaciones genéticas. Niveles altos de ROS se asocian con fragmentación y empaquetamiento defectuosos del ADN espermático (Iommiello, *et al.* 2015). Concentraciones limitadas de ROS son importantes para la regulación de las funciones de los espermatozoides, como lo es la activación acrosómica, capacitación, hiperactivación, señalización celular, entre otros procesos. Sin embargo, a concentraciones muy altas son potencialmente tóxicos (Iommiello, *et al.* 2015; Athayde, *et al.* 2007). El estrés oxidativo se asocia con los marcadores de apoptosis mencionados antes, sugiriendo una relación entre ROS y apoptosis (Aitken, *et al.* 2013).

Otras causas de daño al ADN incluyen los posibles efectos de endonucleasas y caspasas defectuosas (Aitken, *et al.* 2013), exposición a agentes genotóxicos ocupacionales o del ambiente, varicocele, fiebre, entre otros (Bungum, 2011; Edmund, *et al.* 2014). Estrés ambiental, mutaciones genéticas y anormalidad cromosómicas también pueden alterar el funcionamiento normal de los procesos bioquímicos (Shulte, *et al.* 2010). Iommiello, menciona en el 2015 que factores como obesidad, alcoholismo, tabaquismo, infecciones genito-urinales y algunas otras condiciones también pueden afectar.

Gavriliouk y Aitken mencionan en su artículo del 2015 (ver Figura 5) algunos factores que podrían estar relacionados con el daño genómico en espermatozoides. De los más importantes son la edad, la dieta, infecciones, entre otros. Estos espermatozoides dañados podrían encontrarse potencialmente en muestras de semen para TRAs. Cuando entran en contacto con el óvulo, este intentará reparar el daño espermático con los mecanismos internos del óvulo. Sin embargo, muchas veces estos mecanismos no resultan ser suficientes y por lo tanto, la concentración del ADN dañado en el cigoto incrementa y podría generar pérdidas gestacionales, aneuploidías, u otro tipo de complicaciones o efectos secundarios no deseados.

Figura 5. Posibles orígenes de malformaciones embrionarias o gestacionales propuestas por Gavrioliouk y Aitken, 2015 (modificado del inglés).



Como se indica anteriormente, el óvulo puede reparar niveles bajos de daño al ADN con su maquinaria celular al momento de la fecundación, pero niveles de daño demasiado altos resultan en la activación de la apoptosis. Esto resulta en altas tasas de malformaciones embrionarias y/o pérdidas gestacionales tempranas. De manera que la calidad del ADN embrionario depende tanto de la calidad del ADN paterno, como de la capacidad del óvulo para repararlo (Shulte, *et al.* 2010; Hekmatdoost, *et al.* 2009). Otro problema con los ROS es que su acumulación inhibe los mecanismos de reparación del ADN en el óvulo, como NER (reparación por escisión de nucleótidos, por sus siglas en inglés), y tiene especial dificultad en reparar los daños de hebra como tal (Shamsi, *et al.* 2011). Mediante la capacitación de una muestra de semen, ya sea por *swim-up* o por gradientes de densidad, se logra aislar a los espermatozoides de mejor calidad. Sin embargo, no se evalúa la calidad genética y siempre existe cierto porcentaje residual que es indetectable con los métodos tradicionales (Shamsi, *et al.* 2011). A raíz de esto se han desarrollado varios tipos de ensayos para evaluar la integridad y compactación del ADN espermático (Hekmatdoost, *et al.* 2009). Algunos de estos ensayos son marcadores de fertilidad *in vivo* que pueden ayudar a la selección de los mejores espermatozoides para los TRAs en cada pareja individual (Bungum, 2011).

d. Principales formas de medición.

- COMET. Es una electroforesis de espermatozoides individuales, teñidos con un fluoróforo que se une al ADN descondensado (Schulte, *et al.* 2010). Detecta daños al ADN de doble hebra, como de hebra simple. La intensidad del color y el largo de la cola son los factores determinantes del diagnóstico. Los fragmentos más pequeños (más fragmentados) migrarán más que los que no lo estén (Shamsi, *et al.* 2011). Es fácil de hacer, sus precios son moderados y tiene alta reproducibilidad; pero necesita un microscopio de fluorescencia y un técnico con experiencia (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Bungum, 2011).
- TUNEL. Cuantifica la integración de la biotina o el fluorocromo marcado dUTP en rupturas de ADN de simple o doble hebra en una reacción catalizada por TdT (transferasa deoxynucleotidil terminal), independiente del molde. Esta enzima inserta el dUTP o el FITC-dUTP en el extremo 3'-OH de las rupturas de ADN para producir una señal con intensidad dependiente del número de rupturas en la cabeza del espermatozoide. Esta técnica es sumamente precisa, pero es muy costosa (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Shamsi, *et al.* 2011). También existe la opción de evaluar los resultados de la técnica en un citómetro de flujo, pero de igual manera el costo siempre es elevado (Bungum, 2011). Los resultados se reportan como un porcentaje en relación con la población total (Schulte, *et al.* 2010).
- Tinción ácida con azul de anilina. Esta tinción discrimina entre histonas ricas en lisina y protaminas ricas en arginina. Los espermatozoides inmaduros se caracterizan por tener las primeras y por lo tanto se tiñen fácilmente de azul. Además, este ensayo indica un empaquetamiento débil de ADN (Shamsi, *et al.* 2011). Los resultados de esta prueba tienen una correlación negativa con la integridad del ADN y el potencial fecundativo masculino (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Schulte, *et al.* 2010).
- Tinción con azul de toluidina. Mide la integridad de la cromatina (Schulte, *et al.* 2010). Se utiliza un tinte básico para tinciones meta u ortocromáticas de cromatina. La tinción metacromática sucede solo para ADN que esté dañado severamente, por lo que se debería usar en combinación con otras tinciones más eficaces para determinar la integridad (Hekmatdoost, *et al.* 2009). Se necesita un microscopio de luz. Los espermatozoides dañados se teñirán azul, mientras que los sanos permanecerán incoloros (Schulte, *et al.*

2010). Esta técnica presenta límites de repetitividad y un número bajo de espermatozoides que se pueden contar (Hekmatdoost, *et al.* 2009). Tsarev y sus colaboradores reportaron en el 2009 un 45% de predictibilidad de la técnica en cuanto a capacidad fecundativa. Tiene buenas correlaciones con SCSA (ensayo estructural de cromatina espermática) y TUNEL (Shamsi, *et al.* 2011; Kim, *et al.* 2013).

- **Dispersión de cromatina espermática (SCD).** Cuando los espermatozoides son expuestos a un pH ácido, previo a la lisis, y siguiendo con la remoción de proteínas nucleares, se pueden observar halos de dispersión que tienen relación directa con la integridad del ADN (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Foruzan, *et al.* 2011). Con este método se transforma las rupturas extensas en motivos de ADN de hebra simple. ADN fragmentado falla en producir un halo de dispersión característico que si se observa en espermatozoides con ADN intacto (Absalan, *et al.* 2012; Shamsi, *et al.* 2011). No necesita un microscopio de fluorescencia o la determinación del color, es fácil, rápido y reproducible. Sus resultados son tan buenos como los del SCSA (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Absalan, *et al.* 2012). El problema con este ensayo es que algunas células podrían tener diferentes tamaños nucleares, llevando a una variación en el halo generado, pero teniendo el mismo grado de fragmentación (Shamsi, *et al.* 2011).

También se pueden utilizar otras técnicas como el ensayo de integridad de ADN espermático, ensayo estructural de cromatina espermática, la tinción con cromomicina A3, la hibridización *in situ* para la detección fluorescente de ADN dañado, la traslación *in situ*, la tinción con naranja de acridina, o incluso con HPLC (Tsarev, *et al.* 2009 y Schulte, *et al.* 2010). Todas estas técnicas no se discutirán en detalle porque no son relevantes para el estudio. De igual manera, la desventaja general es que ninguno de estos ensayos logra detectar la etiología del daño en el ADN o la patogénesis detrás de ella. Además, todos son altamente invasivos y provocan muerte celular, lo cual impide que los espermias puedan utilizarse luego en alguna TRA (Bungum, 2011; Shamsi, *et al.* 2011).

6. Efectos secundarios del daño al ADN espermático y situación actual. No fue hasta el final de la década de 1980 que se empezó a estudiar una posible asociación de daño en el

ADN espermático con problemas de infertilidad. En 1993 Bianchi y sus colaboradores reportaron que la presencia de ADN espermático dañado tenía una relación inversa con el nivel de protaminas presentes en la cromatina (Aitken, *et al.* 2013).

En pocas palabras, las fuentes de ROS responsables de la inducción del daño oxidativo en el ADN resultan de tres causas: la activación de leucocitos fagocíticos generadores de ROS, la generación de ROS por espermatozoides inmaduros, y la pérdida de la capacidad antioxidante del semen (Gavriliouk y Aitken, 2015; Aitken y Roman, 2009). El problema principal con una concentración alta de ROS no es el daño al ADN como tal o la muerte celular, sino el hecho de que estos espermatozoides, aunque mucho menos, siguen teniendo cierta capacidad fecundativa y por lo tanto existe la posibilidad de que un embarazo resulte de ellos.

Algo que podría suceder a partir de esto es una pérdida gestacional. Se denomina pérdida gestacional recurrente (RPL, por sus siglas en inglés) cuando ocurre una pérdida gestacional dos o más veces consecutivas en el primer o segundo trimestre de embarazo. Dado que la mitad del ADN embrionario proviene del padre y la otra mitad de la madre, las aberraciones en el espermatozoide podrían provocar alteraciones genéticas en el embrión y alterar su desarrollo. Se asocia la RPL idiopática con una incidencia más alta de aberraciones en el ADN espermático (Zidi-Jrah, *et al.* 2016; Aitken, *et al.* 1992).

Las pérdidas gestacionales ocurren en un 10-15% de la población fértil, pero es más alta en las parejas con problemas de fertilidad (Robinson, *et al.* 2012). Altas tasas de mutagenicidad se han relacionado con embarazos ectópicos, pérdidas gestacionales tempranas, malformaciones, síndrome antifosfolipídico, o enfermedades genéticas en niños, inclusive cáncer temprano (Shamsi, *et al.* 2011; Cavagna, *et al.* 2012; Zidi-Jrah, *et al.* 2016; Edmund, *et al.* 2014; Gavriliouk y Aitken, 2015). La probabilidad de problemas genéticos embrionarios debidos al ADN espermático dañado es más alta según avanza la edad de los pacientes porque la capacidad oocitaria de reparar el ADN dañado es menor, y el daño espermático mayor (Robinson, *et al.* 2012; Gavriliouk y Aitken, 2015).

En el metaanálisis de Robinson, *et al.* (2012), se analizaron un total de 2,969 parejas con problemas de fertilidad. Los autores concluyen que sí existe una relación significativa

entre el daño en el ADN espermático y las pérdidas gestacionales tempranas. Además, mencionan que el daño era mayor en el eyaculado en comparación con espermatozoides testiculares.

Varios autores (Hekmatdoost, *et al.* 2009, Absalan, *et al.* 2012, Bungum, 2011; Shulte, *et al.* 2010; Kim, *et al.* 2013; Shamsi, *et al.* 2011; Athayde, *et al.* 2007; Iommiello, *et al.* 2015) han identificado que los parámetros evaluados en el análisis del semen dictaminado por la OMS no son suficientes para determinar totalmente la capacidad fecundativa de los espermatozoides. Los parámetros de la OMS solo evalúan algunos aspectos de la calidad y función de los espermatozoides (Bungum, 2011), pero son muy variables con el tiempo y entre los individuos (Schulte, *et al.* 2010). Las técnicas para determinar la fragmentación y el empaquetamiento de ADN espermático no varían tanto y son un excelente complemento para las evaluaciones tradicionales que se acostumbran. Probablemente sean un mejor y más influyente predictor (Absalan, *et al.* 2012; Shulte, *et al.* 2010; Shamsi, *et al.* 2011). Se han reportado múltiples casos de pacientes con parámetros normales, pero con baja fecundidad (Lewis, 2008; Tsarev, *et al.* 2009; Shamsi, *et al.* 2011; Robinson, *et al.* 2012; Oliva y Multigner, 2006; Athayde, *et al.* 2007). Por ejemplo, Shamsi, y colaboradores reportaron en el 2011 que había un 27% de daño al ADN espermático en sujetos con parámetros normales (según los parámetros de la OMS), mientras que los controles solo tenían un 16.3% de daño. Finalmente concluyen que los parámetros tradicionales de evaluación no son suficientes para clasificar completamente la calidad espermática en una muestra de semen, dado que incluso los sujetos con parámetros normales presentaron porcentajes altos de ADN dañado.

Por otro lado, Athayde menciona en el 2007 que existe evidencia fuerte que sugiere una correlación directa entre daños al ADN y niveles altos de ROS producidos por leucocitos; por lo que sugieren que el parámetro establecido por la OMS para diagnosticar leucospermia debería ser reevaluado (Agarwal, *et al.* 2014).

C. Justificación

En los tratamientos de reproducción asistida se acostumbra a incubar las muestras de semen luego de su obtención a 37°C durante 15 a 30 minutos, para asegurar su licuefacción (OMS, 2013). Existen ciertos factores que podrían alterar el tiempo de incubación. Por ejemplo, las muestras de semen se procesan en el orden en que son obtenidas y es usual que se genere una “cola de muestras” en la incubadora que esperan su turno para ser analizadas. Por lo que dependiendo de la carga de trabajo que se presente en un día en particular, las muestras podrían permanecer en la incubadora durante más tiempo. También ocurre con cierta frecuencia que las muestras no se obtengan en la misma clínica; a veces los pacientes optan por colectarla en otro lugar, como su casa, a pesar de estar más alejado. El tiempo desde que el paciente colecta la muestra y la transporta a la clínica también se considera como tiempo de incubación, con la diferencia que está a temperatura ambiente. En todos los casos, los espermatozoides quedan expuestos a agentes oxidantes del ambiente y del líquido seminal, durante su incubación (Aitken, et al. 1999; Athayde, *et al.* 2007). Los principales productores de estos agentes oxidantes son los leucocitos y espermatozoides inmaduros (Shulte, *et al.*, 2010; Hekmatdoost, et al. 2009). Ambos se encuentran naturalmente en el semen y una baja concentración de ellos ayuda a la maduración de los espermatozoides y su capacitación. Mientras que un exceso, induce la fragmentación del ADN (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Iommiello, *et al.* 2015). Se ha reportado hasta un 25% de hombres infértiles con niveles de ROS aumentados, así como una correlación directa con daños al ADN (Shulte, *et al.*, 2010; Athayde, *et al.* 2007).

En los últimos años se han publicado varios estudios (Iommiello, *et al.* 2015; Athayde, *et al.* 2007; Agarwal, *et al.* 2014; Sharma, *et al.* 2001) en donde los autores exponen la importancia de la medición de ROS y concentración de leucocitos en una muestra de semen. En el estudio de Sharma del 2001 intentaron establecer un mínimo de concentración de ROS que no perjudicara a los espermatozoides, pero no lograron encontrar un valor específico. Mientras que en el caso del estudio de Athayde confirmaron que existe una relación directa entre los niveles de ROS y la concentración de leucocitos. En cuanto al estudio de Iommiello confirmaron que el estrés oxidativo genera fragmentación al ADN espermático. Y, por último, en el estudio de Agarwal relacionaron las tres variables: concentración de leucocitos, niveles de ROS y fragmentación de ADN y concluyen que incluso con niveles bajos de

leucocitos, si se generan ROS que fragmentan al ADN. Sin embargo, en ninguno de estos estudios –ni en ningún otro que conozca a la fecha– evalúan la variable tiempo. Como se explicó anteriormente, el tiempo de incubación es un paso fundamental en la preparación de muestras de semen para TRAs y es algo que debería ser evaluado.

A partir de ello surge la necesidad de determinar el tiempo exacto y el grado de daño al ADN espermático durante el período de incubación y relacionarlo con la concentración de especies oxidantes en el semen generadas por leucocitos. Con esto se podría determinar el tiempo máximo para procesar una muestra de semen en tratamientos de reproducción asistida, evitando daño a su ADN por causas externas. Con esto se conservaría la integridad de su ADN y por consiguiente mejorarán los resultados de los tratamientos de reproducción asistida. El establecer estos valores ayudaría a identificar los valores patológicos de ROS en hombres infértiles y a guiar las intervenciones clínicas en ellos. Resultaría en un avance importante para los TRAs porque el procesamiento de las muestras de semen sería en el tiempo ideal y se minimizaría al máximo la influencia de factores externos en la calidad de esta. Esto resultaría en una capacidad fecundativa más alta y reduciría la tasa de pérdidas gestacionales o complicaciones en el desarrollo embrionario tales como aneuploidías o aberraciones cromosómicas (Enciso y Wells, 2013; Zidi-Jrah, *et al.* 2016; Iommiello, *et al.* 2015). Además, se propondría un estándar como máximo de tiempo de incubación para las muestras de semen durante su procesamiento, incluyendo aquellas que no logren licuarse en ese tiempo. Al incubar las muestras a este tiempo preciso, los biólogos de la reproducción podrán tener la certeza de que cualquier resultado, ya sea positivo o negativo, se debe a factores biológicos exclusivamente y no por la manipulación de las muestras.

D. Objetivos

1. Objetivo general

Determinar el tiempo máximo de incubación de muestras de semen en tratamientos de reproducción asistida para minimizar el daño al ADN debido a ROS producidos por leucocitos.

2. Objetivos específicos

- a. Determinar la correlación entre la concentración de ROS en muestras de semen y diferentes concentraciones de leucocitos.
- b. Determinar a partir de qué concentración de leucocitos inicia la fragmentación y descompactación en el ADN espermático, debido a la producción de ROS.
- c. Cuantificar la fragmentación y la compactación del ADN espermático a diferentes tiempos de incubación, luego de su obtención debido a la producción de ROS por leucocitos.

II. MÉTODOS

A. Procedimiento

Figura 6. Diagrama de flujo de la estandarización de procedimientos para análisis de muestras.

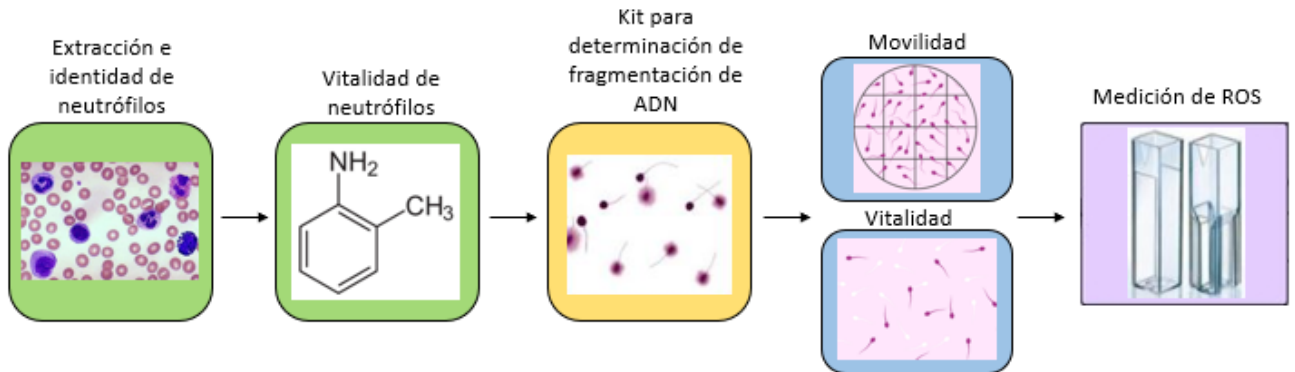
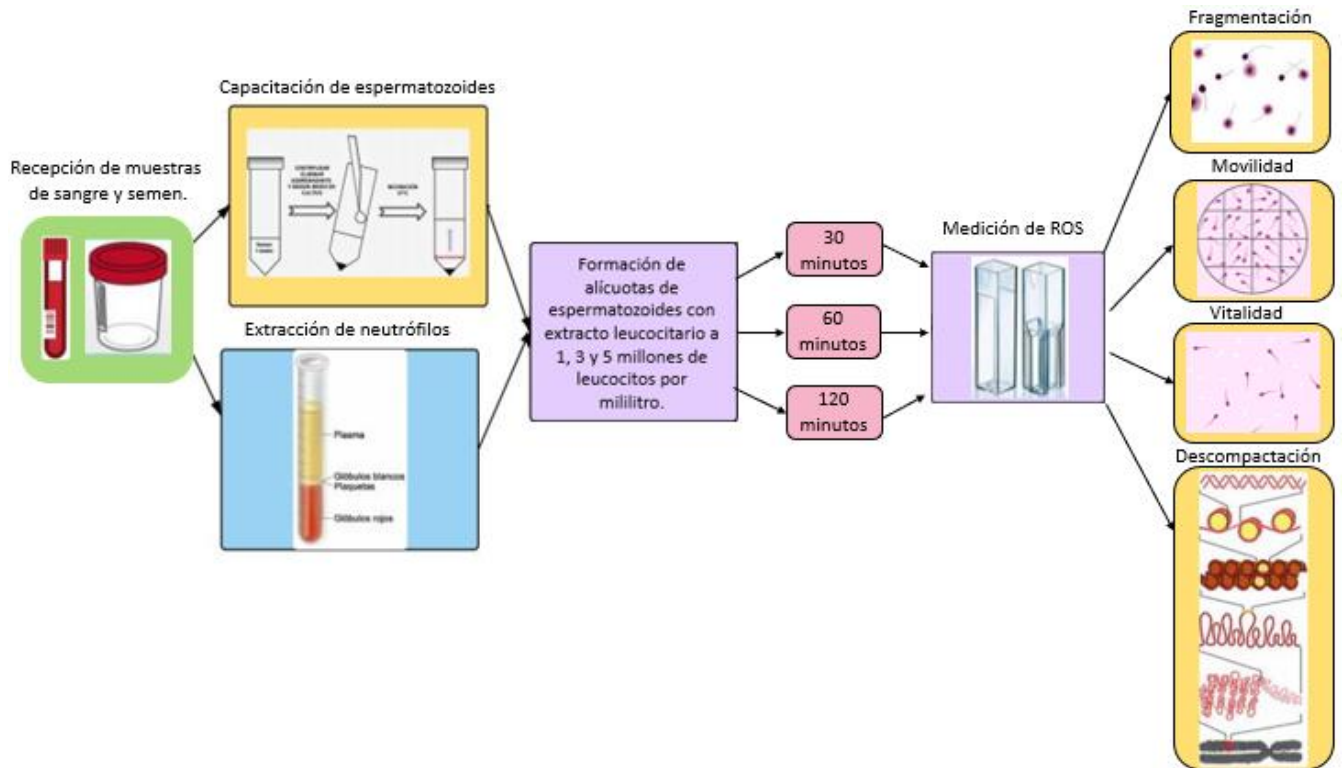


Figura 7. Diagrama de flujo del análisis de muestras.



1. Obtención de muestras de semen. Se trabajó con 6 muestras de semen dado que fue una prueba piloto (Zar, 2010; ICH, 1996). Los sujetos fueron donantes de semen voluntarios (criterios de exclusión en Anexo 3) que tenían parámetros de semen dentro de los límites normales, según la OMS; que supieron leer o escuchar el consentimiento informado (ver Anexo 1) y pudieron firmarlo. Todos tenían entre 18 y 35 años. Además, se les solicitó un período de abstinencia sexual de 3-5 días y una concentración espermática mayor a 5 millones de espermatozoides por mL; con un volumen de eyaculado de por lo menos 2 mL. El método de reclutamiento fue verbal por parte del Licenciado Fredy Mejía, proceso donde fue explicado el estudio, firmado el consentimiento informado y agendada una cita anónima para la colección de las muestras de semen y sangre. La muestra de semen fue obtenida por medio de masturbación dentro de la clínica Gestar®, ubicada en la 6ª avenida 3-95, zona 10 en el edificio Hope International, segundo nivel, en un cuarto privado; y fueron depositadas en recipientes estériles para su procesamiento inmediato. Se trabajó con un código anónimo asignado en la clínica Gestar® a cada muestra para su identificación, que se asignó al momento de ingresar a la clínica, por parte de la recepcionista. Este código anónimo estaba completamente desligado a la identidad de los sujetos. Los consentimientos informados fueron almacenados en un mueble especial, bajo llave. Solo el licenciado Fredy Mejía tiene copia de la misma.

2. Procesamiento de muestras de semen. Las muestras de semen se trabajaron según los parámetros de la OMS para evaluar vitalidad, morfología, pH, concentración, movilidad, y residuos celulares. Se utilizó el tratamiento de gradientes de densidad reportado por la OMS para la capacitación de los espermatozoides.

3. Obtención de leucocitos en sangre. Se tomó primero la muestra de semen y luego la de sangre para evitar incomodidades durante la obtención de la misma. Se trabajó con 8 mL de sangre intravenosa del antebrazo del sujeto por parte de una enfermera capacitada, trabajadora de la clínica. Se asignó a la muestra de sangre el mismo código anónimo que correspondía con la muestra de semen. La sangre fue depositada en tubos de ensayo preparados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para evitar su coagulación. Se extrajeron leucocitos de la sangre por medio de gradientes de centrifugación y se tiñeron con Azure A, según el protocolo de la OMS del 2013 para su identificación y con la tinción de

orto-toluidina para verificar su actividad metabólica. Estos se co-cultivaron con la muestra de semen capacitada a diferentes concentraciones (1, 3 y 5 millones de leucocitos/mL), manteniendo una concentración de espermatozoides constante de 5 millones/mL en todas las muestras.

- Gradientes de centrifugación según lo reportado por Kovalski, *et al.* 1991 y Cuellar 2008 con modificaciones:
 - a. Dividir los 8 mL de sangre en 4 alícuotas iguales.
 - b. Agregar 10 mL de NH_4Cl al 0.87 % a cada una y dejar reposar por 20 minutos a temperatura ambiente.
 - c. Centrifugar a 600 x g a temperatura ambiente, por 10 minutos, para formar un botón. Descartar sobrenadante y remover el sobrante por aspiración con una micropipeta.
 - d. Re suspender los botones en 350 μl de NH_4Cl al 0.87 %.
 - e. Formar un gradiente de Percoll con 1 mL de solución al 55 %, 1.5 mL al 40 %, 1 mL al 30 %, y 1 mL al 20 %. Finalmente depositar la re-suspensión. Amortiguar todas las soluciones con solución salina Hepes (130 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 14 mM fructosa y 10 mM de Hepes a pH 8) y suplementarlo con 10 mg/mL de BSA.
 - f. Centrifugar a temperatura ambiente a 1,300 x g por 30 minutos.
 - g. Recuperar leucocitos de la interface L4.

- Tinción de *orto*-toluidina según la OMS, 2013 con modificaciones:
 - a. Preparar las siguientes soluciones: Buffer de fosfatos, 67 mmol/L, pH 6.0: disolver 9.47 g de Na_2HPO_4 en 1000 mL de agua destilada y 9.08 g de KH_2PO_4 en 1000 mL de agua destilada. Agregar una solución de 88 mL KH_2PO_4 hasta que el pH sea de 6.0
 - b. Cloruro de amonio saturada (NH_4Cl): 250 g de NH_4Cl a 1000 mL de agua destilada.
 - c. Na_2EDTA 148 mm/L: disolver 50 g/L en buffers de fosfato (pH 6.0) preparado antes.

- d. Sustrato: disolver 2.5 mg de *orto*-toluidina en 10 mL de solución salina 0.9 %.
- e. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% v/v comercial.
- f. Solución de trabajo: a 9 mL de la solución sustrato de *orto*-toluidina, agregar 1 mL de la solución de NH₄Cl saturada, 1 mL de la solución 148 mmol/L de Na₂EDTA, y 10 µL de H₂O₂ al 30% (v/v) y mezclar bien.
- g. Remover 0.1 mL de semen y mezclar con 0.9 mL de la solución de trabajo.
- h. Vortexear por 10 segundos e incubar a 36 °C por 60 minutos.
- i. Centrifugar por 5 minutos a 0.5 rcf.
- j. Decantar sobrenadante y re suspender el botón con la solución restante.
- k. Colocar 10 µL de re suspensión en un porta objetos y cubrir con un cubre objetos. Observar en un microscopio de luz con aumento de 40X.
- l. Contar por lo menos 100 células. Las células redondas permanecerán incoloras y los leucocitos se teñirán de color café.

4. Medición de ROS en semen. Se realizó una tabla de Excel con las fórmulas correspondientes para solo ingresar volumen y concentración de extracto leucocitario, volumen y concentración de semen capacitado y volumen de wash para que generara volúmenes finales necesarios de cada producto (extracto, semen, y wash) para agregar al tubo de muestra, manteniendo una concentración constante de 5 millones de espermias por mL, en todas las muestras. Luego, se dividió la muestra en tres alícuotas del volumen total y se incubaron a 37 °C con una solución de NBT 0.1 %, por tiempos cortos de incubación (30, 60 y 120 minutos). Se utilizó el ensayo de nitro azul de tetrazolio (NBT) reportado en Kovalski, *et al.* 1991 y Vessey *et al.* 2014 para medir los ROS generados, con la modificación reportada en Amarasekara, *et al.* 2012 y Yang, *et al.* 2016. Se utilizó como control negativo 390 µL de PBS con 10 µL de solución NBT 0.1 %. Se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de formazan (0, 300, 600 y 1200 µg).

- a. Colocar en un tubo de fondo redondo de 5 mL el volumen necesario de la muestra de semen capacitada de manera que permanezca una concentración de 5 millones/mL.
- b. Agregar el volumen de wash necesario para diluir a la concentración necesaria.

- c. Agregar el volumen de neutrófilos extraídos según la concentración que corresponda a la muestra; ya sea 1, 3 o 5 millones/mL.
- d. Formar tres alícuotas de la muestra en tres tubos Eppendorf® de 1.5 mL.
- e. Esperar el tiempo de incubación correspondiente.
- f. Agregar la solución de NTB al 0.1 % en una proporción 1:1 con la muestra.
- g. Incubar por 45 minutos a 37 °C.
- h. Centrifugar por 5 minutos a 500 g y descartar sobrenadante.
- i. Agregar 400 µL de PBS 1X y repetir paso anterior. Repetir dos veces.
- j. Agregar 400 µL de PBS 1X, y 120 µL de DMSO en KOH 2M. Vortexear.
- k. Agregar 200 µL a un pozo en la cubeta para el lector de ELISA.
- l. Medir a 630 nm. Trabajar en duplicado.

5. Medición de fragmentación de ADN espermático. Se trabajó con el Kit de medición SpermFunc® DNAf Kit for determination of the DNA fragmentation level in spermatozoa (SCD Method), según las instrucciones del fabricante (ver Anexo 5 y 6).

6. Medición de integridad de ADN espermático. Se trabajó con la tinción de azul de anilina reportada en Kim, *et al.* 2013 y Zidi-Jrah, *et al.* 2016.

- a. Frotar 20 µl de la muestra de semen en un porta objetos y dejar secar al aire.
- b. Fijar con una solución de 4 % formalina durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- c. Lavar con agua y teñir con una solución al 5 % de azul de anilina en 4 % de ácido acético y lavar con agua.
- d. Teñir con una solución de 5 % de eosina como colorante de contraste.
- e. Evaluar 300 espermatozoides con un microscopio de luz.
- f. Espermatozoides dañados se tiñen de azul, y los sanos se tiñen de rosado.
- g. Reportar resultados en porcentaje de espermatozoides dañados con relación a la población total.

7. Descarte de muestras y suministros. Todas las muestras y suministros se descartaron en una bolsa roja de Ecotermo® específica para el estudio, apropiada para su naturaleza; ya sea punzo cortante o no; según las disposiciones vigentes de ley en Guatemala. Todas las muestras fueron destruidas inmediatamente después de haber concluido su procesamiento en el laboratorio el mismo día.

8. Análisis de datos. Se inició el cálculo de promedios, medianas y desviaciones estándar de los datos de los 6 sujetos, seguido de una comparación de las muestras con los controles por medio de una prueba de Wilcoxon, y una comparación de los datos en los tres tiempos de medición por medio de una prueba de Friedman con test de Dunn. Por último, se calculó el parámetro de correlación, R^2 para determinar si existía una relación lineal entre las variables (Murphy, *et al.* 2009; Zar, 2010). No se realizaron más pruebas estadísticas dado que solo se trabajó con 6 muestras, por ser prueba piloto (Thabane, *et al.* 2010). Existe la posibilidad de que variables como estrés, dieta, ejercicio, consumo de alcohol o cigarrillos, cansancio y variación del peso, entre otros, afecten los resultados del estudio. Sin embargo, no se tomaron en cuenta dado que son variables que se encontraron fuera los alcances del estudio. Los datos originales y resultados están almacenados en forma digital en la computadora del Lic. Mejía, custodio, (ubicada dentro de la clínica Gestar®), bajo un usuario y contraseña exclusiva a nombre de él, y pasaron a ser totalmente confidenciales. Solo él tiene acceso a la base de datos. Los resultados finales serán presentados al personal de la clínica y al personal de la UVG (sin ningún identificador) con posibilidad de publicación en una revista científica o poster. Además, el trabajo final será almacenado en la biblioteca de la UVG (18 Av. 11-95 zona 15 Vista Hermosa III) a partir del mes de abril 2018, a disposición de la universidad.

9. Riesgo – beneficio del estudio. Se estableció como único riesgo para el donante: inconvenientes habituales de un análisis clínico de rutina como formación de hematomas, mareo, somnolencia o dolor al tacto en el área. Como beneficios se establecieron la entrega de resultados de un espermograma tradicional, al día siguiente de la donación de semen. Además, recibieron una compensación de Q 70.00 por las molestias e inconvenientes causados por su participación (costo de transporte aproximado y dos horas de parqueo). No se realizaron exámenes para diagnóstico de enfermedades infecciosas en los donantes debido

a que no se contó con los recursos financieros para ello. El beneficio para la comunidad fue generar información que ayudó a mejorar los tratamientos de reproducción asistida y las tasas de embarazos en parejas con problemas de fertilidad.

En cuanto al investigador se establecieron los siguientes riesgos: posible contaminación con semen, para lo que se utilizaron guantes de nitrilo y bata en todo momento y en caso de contaminación se procedió a lavado microbiológico inmediato de toda el área y cambio de guantes (ver Anexo 2); todos los riesgos que conlleva el uso de microscopio, porta y cubre objetos como cortes o perforaciones, derrame/contacto con reactivos para lo que se contó con un lavamanos y lavaojos de emergencia con jabón desinfectante e hidróxido de sodio de alcance inmediato. Se trabajó en cuatro habitaciones: masturbatorio, cuarto de colecta de muestras de sangre, laboratorio de andrología y cuarto de espectrofotometría. El investigador solo tuvo contacto con las últimas dos habitaciones. Las muestras de semen se trabajaron con nivel de bio seguridad 2, según el manual de la OMS del 2013 y las recomendaciones establecidas en el manual del CDC NIH 4^a edición, del 2006. Se realizaron pruebas para diagnóstico de enfermedades infecciosas (VIH, hepatitis A y hepatitis B únicamente, por ser las más riesgosas) en el investigador antes de iniciar con el proyecto y luego de concluirlo. En ningún caso se detectó infección. El beneficio para el investigador al trabajar con estas muestras fue generar una tesis como trabajo de graduación.

III. RESULTADOS

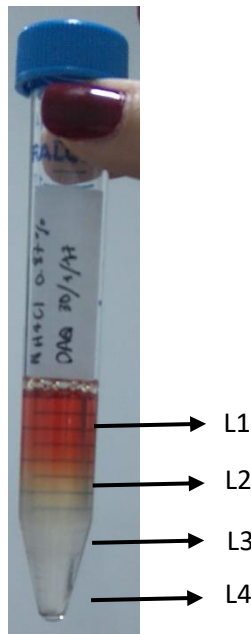
A. Estandarización de métodos

Aislamiento de neutrófilos viables a partir de sangre periférica para co-cultivarlos con espermatozoides

Con el objetivo de estandarizar el procedimiento de extracción de neutrófilos viables a partir de sangre periférica, para poder ser co-cultivados posteriormente con espermatozoides, realicé la implementación y modificación del procedimiento reportado por Kovalski, *et al.* en 1991. Trabajé con muestras de sangre de 2 individuos voluntarios. Las características de las muestras de los sujetos participantes se presentan en el Anexo 4.

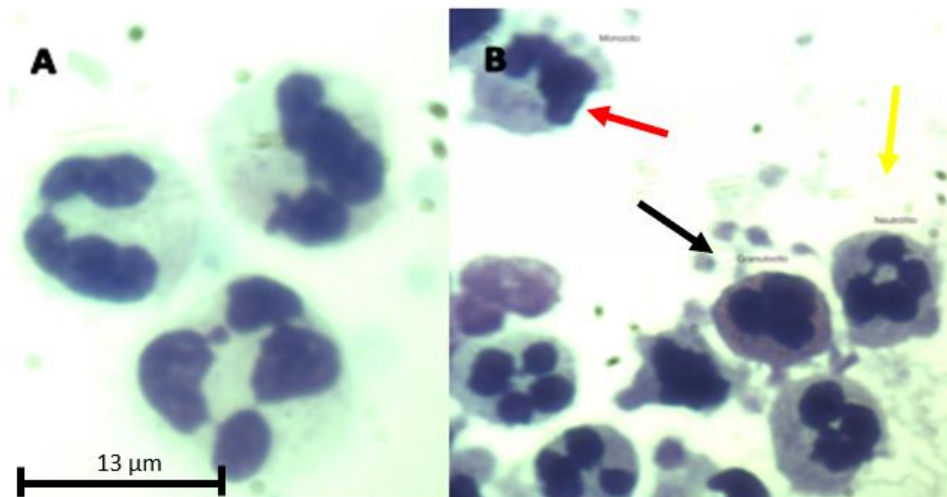
Inicialmente, realicé el aislamiento de neutrófilos a partir de sangre periférica. Al realizar dos centrifugaciones se formaron cuatro fases marcadas (ver Figura 8). Una fase L1 con coloración rojiza, indicando contaminación eritrocítica; L2 color amarillo turbio indicando contaminación celular, y dos últimas fases sin coloración: L3 y L4. A pesar de que ambas fases fueron incoloras, se identificó que solo la L4 contenía las células de interés, por lo que trabajé con ella en lugar de utilizar la L3.

Figura 8. Fases formadas durante la segunda centrifugación para el aislamiento de neutrófilos de sangre periférica.



Seguidamente evalué la morfología e identidad de las células aisladas de la fase L4 con una tinción de Azure A (OMS, 2015) para poder verificar que fueran neutrófilos. Conjuntamente, evalué la concentración y variedad celular en el extracto para asegurar que en su mayoría fueran neutrófilos (Figura 9A) y la contaminación de otros leucocitos fuera mínima (Figura 9B). Por último, evalué la actividad metabólica con una tinción de *orto*-toluidina para asegurar su vitalidad (Figura 10) (OMS, 2011).

Figura 9. Aislamiento de leucocitos en sangre periférica. Los neutrófilos fueron teñidos con Azure A. **A.** La tinción se utilizó para identificar neutrófilos en la fase L4. **B:** Se observan los diferentes tipos celulares que se aislaron a partir de la fase L4. Monocitos (flecha roja), granulocitos (flecha negra) y neutrófilos (flecha amarilla). Magnificación en microscopio para A y B de 1,000X.



La interfase L4 (Figura 9B) presentó tipos celulares adicionales a los neutrófilos, entre estos: Monocitos, aquellas células que presentan un solo núcleo segmentado con la sección derecha más gruesa que la izquierda; Granulocitos, células con múltiples gránulos rosados dispersos en el citoplasma, y finalmente, células polimorfonucleadas, con núcleos alargados, conectados entre sí y sin gránulos rosados. Todas las células identificadas fueron clasificadas según las sugerencias por Welsch, 2009. Interesantemente, no encontré linfocitos en la interfase L4 dado que se trata de los leucocitos menos densos y por lo tanto se acumulaban en las capas superiores de gradiente. Las concentraciones totales observadas fueron de 6

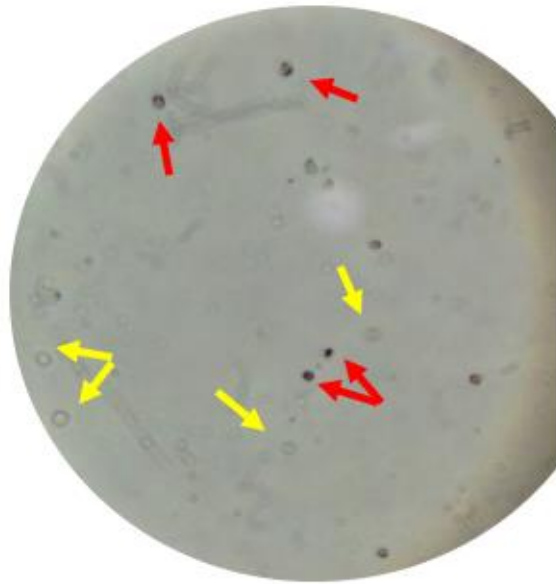
millones de leucocitos por mililitro, para todas las extracciones. Las concentraciones promedio de cada tipo celular se muestran en el Cuadro 1. Una concentración de 90% de neutrófilos en el aislamiento celular confirmó la efectividad de la extracción a partir de sangre periférica. Las concentraciones fueron calculadas por tres trabajadores de la clínica y se reporta un promedio.

Cuadro 1. Concentraciones promedio aproximadas de leucocitos polimorfonucleares en muestras de sangre periférica.

| Tipo de célula | Concentración (%) |
|-------------------------|--------------------------|
| Neutrófilos | 90 |
| Granulocitos | 5 |
| Monocitos y eosinófilos | 5 |
| Linfocitos | 0 |

Finalmente, evalué la actividad metabólica de los neutrófilos con una tinción de *orto*-toluidina (OMS, 2013). El extracto final, fase L4, se caracterizó por tener mayores porcentajes de neutrófilos viables; a este se referirá de ahora en adelante como el extracto leucocitario. En la Figura 10 se observan células teñidas de color café, indicando su actividad peroxidasa. Aproximadamente el 85% de las células fueron reactivas a la tinción, lo que indica en su mayoría las células mantenían actividad biológica después de aislarlas. El resto de células se clasificaron como no viables, ya que no reaccionaron a la tinción con *orto*-toluidina. De esto pude concluir que el extracto final usado para el co-cultivo constituía mayoritariamente de neutrófilos metabólicamente activos.

Figura 10. Leucocitos metabólicamente activos en sangre periférica



Luego de teñir el aislado leucocitario con *orto*-toluidina se observaron células no reactivas a la tinción (flechas amarillas) y células reactivas a la tinción (flechas rojas). Magnificación microscópica 40X.

Pruebas iniciales de movilidad y vitalidad espermática en el tiempo

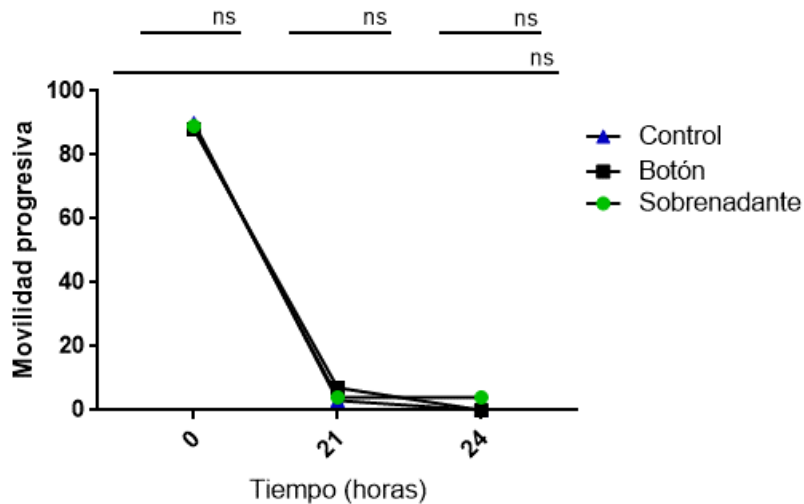
Con el fin de evaluar los efectos del co-cultivo espermático con el extracto leucocitario de sangre periférica estudié la movilidad y vitalidad espermática usando un intervalo de 3, 21 y 24 horas. Para evaluar la movilidad y vitalidad realicé conteos de 500 espermatozoides a partir de la muestra co-cultivada con un extracto leucocitario con una concentración de 2 millones por mililitro. Para ello se clasificaron a los espermatozoides dentro de una de las siguientes categorías: movilidad progresiva: espermatozoides que nadan unidireccionalmente; móviles: espermatozoides que nadan en un solo lugar; inmóviles: espermatozoides que no se mueven; vitalidad: espermatozoides que conservan su viabilidad. Se observaron en un microscopio a 20X de aumento. En cuanto a la vitalidad se clasifican según su coloración con una tinción con eosina. Coloración rosada: muerto, coloración blanca: vivo. Se observaron en un microscopio a 40X de aumento. En la Figura 11 y 12 se observan los efectos promedio sobre la movilidad y vitalidad espermática luego de ser co-cultivados con el extracto leucocitario; además, de su relación con el tiempo. Comparé la movilidad y vitalidad espermática co-cultivando espermatozoides solo con el botón del extracto leucocitario, o solo con el sobrenadante del extracto leucocitario con el fin de verificar si

había alguna diferencia entre los dos co-cultivos.

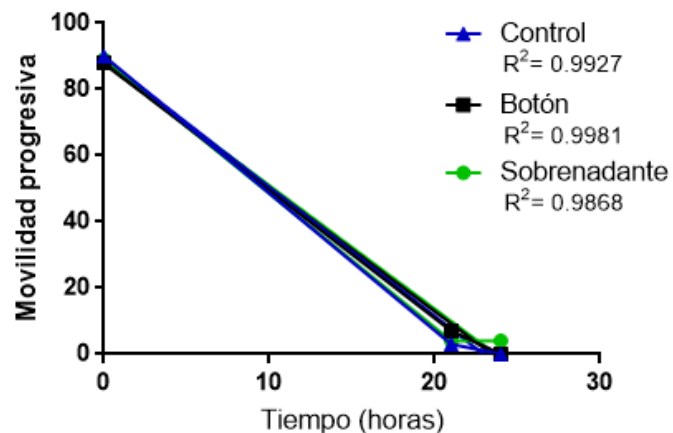
Figura 11. La movilidad progresiva se reduce después de 21 horas de co-cultivo con neutrófilos, medio de cultivo para neutrófilos o sin neutrófilos.

A. En el tiempo cero se aprecian valores para la movilidad progresiva estadísticamente iguales para las tres muestras, cosa que se corroboró con la prueba de Wilcoxon que confirmó un cambio no significativo entre ellas ($p = > 0.05$). Encontré el mismo comportamiento para las 21 y 24 horas. Además, no encontré un cambio significativo (Friedman, $p = > 0.05$) de la movilidad progresiva en el tiempo, independientemente del tipo de muestra. **B.** Se aprecia una tendencia lineal de disminución de la movilidad progresiva en el tiempo, iniciando desde el minuto 1.

A. Variación de la movilidad progresiva en el tiempo según el tipo de muestra



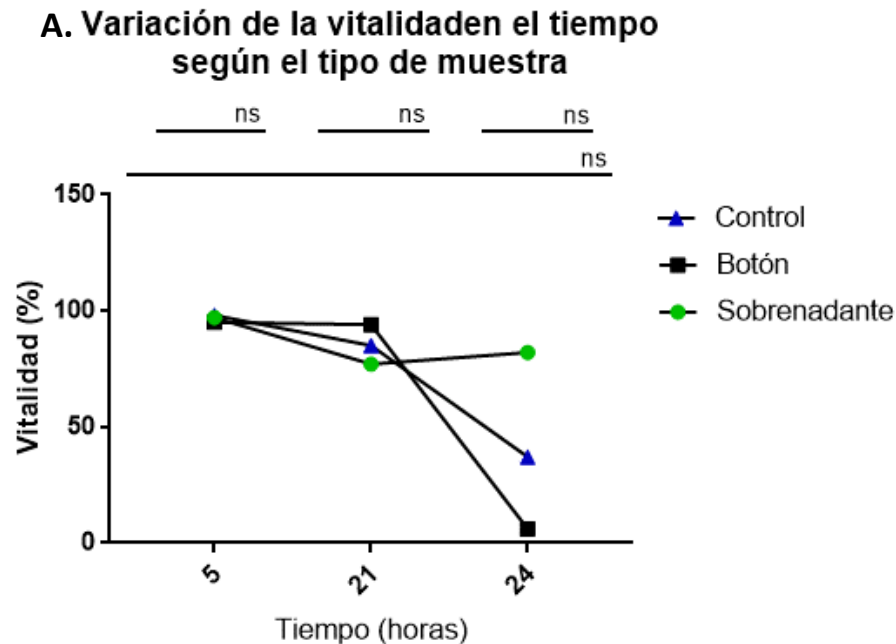
B. Relación de la movilidad progresiva con el tiempo según el tipo de muestra



Control (triángulo azul): muestra de semen incubada sin neutrófilos, Botón (cuadrado negro): muestra de semen incubada con el botón del extracto leucocitario, Sobrenadante (círculo verde): muestra de semen incubada con sobrenadante de muestra leucocitaria. Se trabajó con un extracto leucocitario con una concentración de 6 millones de leucocitos por mililitro. NS: no significativo ($p > 0.05$).

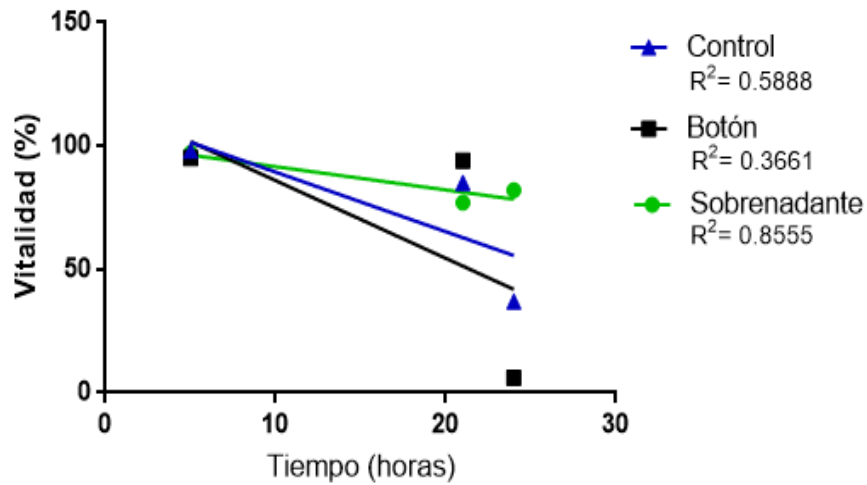
Figura 12. No hay efectos significativos sobre la vitalidad espermática promedio luego del co-cultivo con neutrófilos extraídos de sangre periférica; comparando sobrenadante, botón y control.

A. En el tiempo cero se aprecian valores para la vitalidad estadísticamente iguales para las tres muestras, cosa que se corroboró con la prueba de Wilcoxon que confirmó un cambio no significativo entre ellas ($p > 0.05$). Observé el mismo comportamiento para las 21 horas. A las 24 horas se observan valores más bajos para el botón, seguido del control y los más altos para el sobrenadante. Sin embargo, con este tamaño de muestra, tampoco se detectó una diferencia significativa (Wilcoxon, $p > 0.05$). Además, no encontré un cambio significativo (Friedman, $p > 0.05$) de la vitalidad en el tiempo, independientemente del tipo de muestra. **B.** No se aprecia una tendencia lineal de disminución de la vitalidad en el tiempo, para ningún tipo de cultivo.



Continuación Figura 12.

B. Relación de la vitalidad con el tiempo según el tipo de muestra

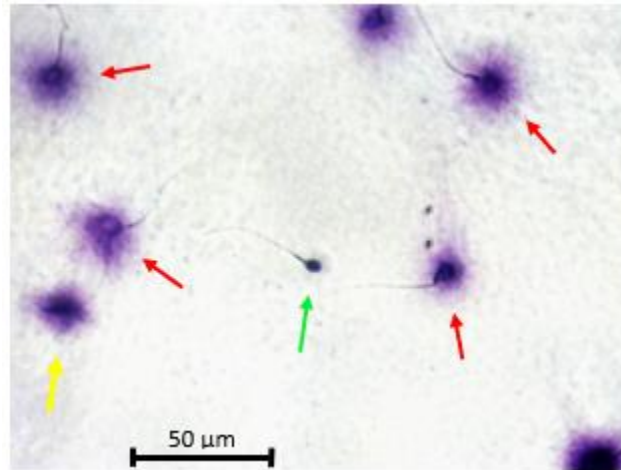


Control (triángulo azul): muestra de semen incubada sin neutrófilos, Botón (cuadrado negro): muestra de semen incubada con el botón del extracto leucocitario, Sobrenadante (círculo verde): muestra de semen incubada con sobrenadante de muestra leucocitaria. Se trabajó con un extracto leucocitario con una concentración de 6 millones de leucocitos por mililitro. NS: no significativo ($p > 0.05$).

Porcentaje de fragmentación de ADN espermático (DFI) en el co-cultivo espermático con el extracto leucocitario.

Con el objetivo de analizar el porcentaje de fragmentación de ADN en espermatozoides a lo largo del tiempo de co-cultivo con extracto leucocitario, estandaricé el uso del kit de medición SpermFunc® DNaf Kit for determination of the DNA fragmentation level in spermatozoa (SCD Method).

Figura 13. Fragmentación de ADN espermático en una muestra desconocida.



Magnificación 40X. Se identifican como células sin fragmentación a las que presentan un halo de dispersión alrededor (flechas rojas); mientras que las células que no lo presentan se identifican como fragmentadas (flecha verde). Tanto los espermatozoides como los neutrófilos (flecha amarilla) son susceptibles al uso del kit.

Al utilizar el kit observé a todas las células teñidas de morado, lo cual indicaba la presencia de ADN en ellas (Figura 13). Al someter la primera muestra a la tinción del kit omití el paso de incubación a 37 °C por 5 minutos luego de calentar el agar a 60°C (para más detalles, ver Anexos 5 y 6). Este error resultó en una desnaturalización accidental de los espermatozoides. Fue evidente al verlo al microscopio porque los espermatozoides se miraban difusos e indefinidos, lo cual imposibilitaba su evaluación. Al repetir el proceso, tomando en cuenta la temperatura, se obtuvo el resultado esperado (Figura 13) y fue posible su evaluación. Se calculó un DFI de 6.70%, promedio entre tres conteos realizados por personas diferentes, resultado que consideré normal por ser menor al 20% (Hekmatdoost, *et al* 2009; Absalan, *et al.* 2012).

Evaluación visual de la concentración de ROS en las muestras

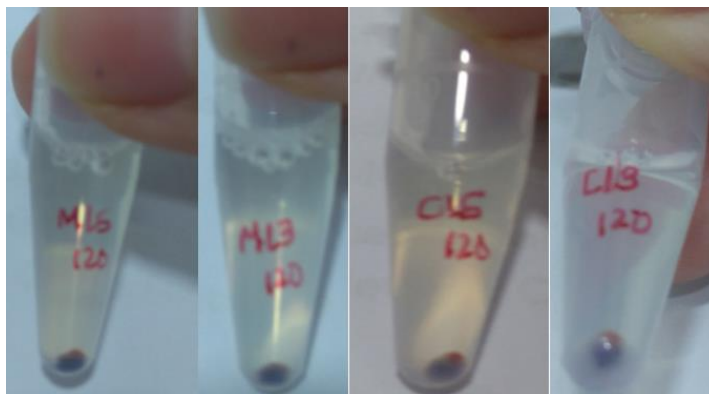
Con el objetivo de evaluar visualmente la formación de formazan clasifiqué los botones de las muestras en cuanto a la intensidad de su coloración. Designé arbitrariamente una escala a partir de la intensidad del color azul perceptible a mi ojo. Además, fotografié las muestras como evidencia visual.

Cuadro 2. Medición visual de la formación de ROS por coloración de botón celular generado, según la muestra.

| Muestra | Coloración |
|---------|------------|
| CS | - |
| CL1 | + |
| CL3 | +++ |
| CL5 | ++++ |
| ML1 | ++ |
| ML3 | +++ |
| ML5 | +++++ |
| N | - |

ML5: espermatozoides incubados con 5 millones de neutrófilos por mL; ML3: espermatozoides incubados con 3 millones de neutrófilos por mL; ML1: espermatozoides incubados con 1 millón de neutrófilos por mL; CS: espermatozoides simples; CL1: control leucocitario con 5 millones de neutrófilos por mL; CL3: control leucocitario con 3 millones de neutrófilos por mL; CL1: control leucocitario con 1 millón de neutrófilos por mL; N: control negativo. El número de + indica la intensidad de la coloración y un – indica que no presentaba coloración de ningún tipo.

Figura 14. Presencia de ROS en botones celulares, según la muestra.



ML5: espermatozoides incubados con 5 millones de neutrófilos por mL; ML3: espermatozoides incubados con 3 millones de neutrófilos por mL; ML1: espermatozoides incubados con 1 millón de neutrófilos por mL; CS: espermatozoides simples; CL1: control leucocitario con 5 millones de neutrófilos por mL; CL3: control leucocitario con 3 millones de neutrófilos por mL; CL1: control leucocitario con 1 millón de neutrófilos por mL; N: control negativo.

En el Cuadro 6 y Figura 13 se aprecian los resultados de la coloración de los botones azul-negro en las muestras a los 120 minutos de incubación. Las muestras con mayor

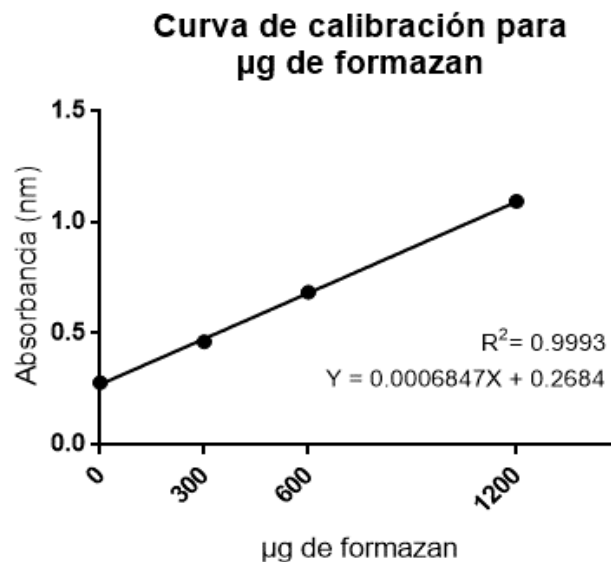
concentración leucocitaria presentaron el botón con más coloración, mientras que la que solo contenía espermatozoides no presentaron ninguna coloración, lo cual indicó una mayor formación de formazan debido a la reacción con las ROS de la muestra.

B. Evaluación de muestras de semen de donantes con metodología estandarizada previamente.

Medición de ROS según el tiempo de incubación (0, 30 y 120 minutos) y según la concentración leucocitaria en la muestra (1, 3 y 5 millones de neutrófilos por mL).

Con el objetivo de conocer si existe una relación entre el tiempo de incubación y concentración leucocitaria; se evaluaron las muestras en tres tiempos de medición y con tres concentraciones de leucocitos.

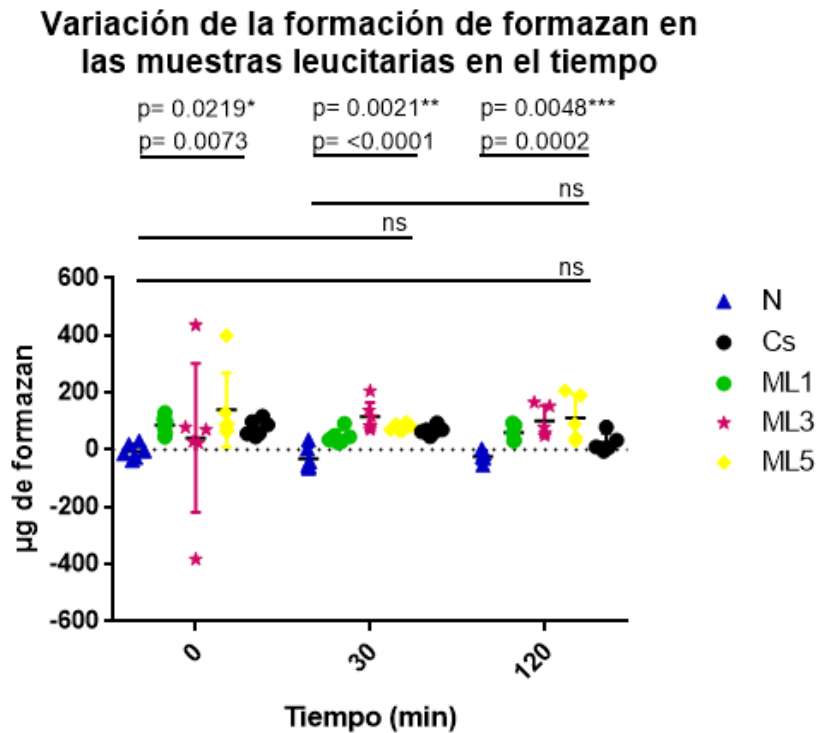
Figura 15. Curva de calibración de absorbancia, según la cantidad de formazan.



N=6

En la Figura 15 se aprecia la curva de calibración realizada para el cálculo de absorbancias. Se observa una correlación entre los µg de formazan y la absorbancia (R^2 : 0.9993).

Figura 16. Comparación de la cantidad de formazan producido a lo largo del tiempo, según la concentración neutrófila.



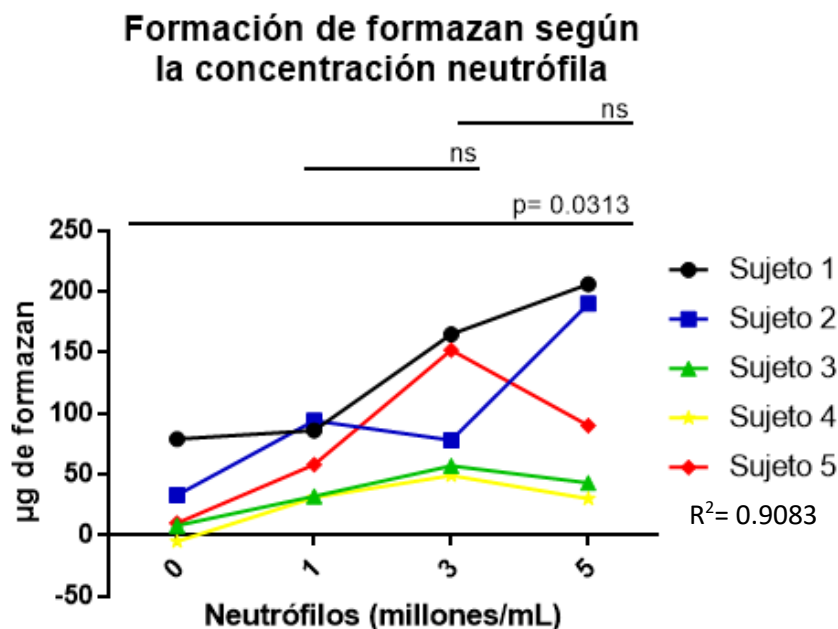
ML5 (rombo amarillo): espermatozoides incubados con 5 millones de neutrófilos por mL; ML3 (estrella rosada): espermatozoides incubados con 3 millones de neutrófilos por mL; ML1 (círculo verde): espermatozoides incubados con 1 millón de neutrófilos por mL ($n=6$); CS (círculo negro): espermatozoides simples; N (triángulo azul): control negativo ($n=6$). NS: no significativo (Friedman y Dunn ($p > 0.05$), y Wilcoxon ($p > 0.05$)). Los valores p con asterisco corresponden a la diferencia más significativa al comparar todas las muestras: $p^* = N$ y ML5, $p^{**} = N$ y ML3, $p^{***} = N$ y ML3.

No observé un cambio significativo en la formación de formazan con el paso del tiempo, independientemente de la muestra o concentración celular. Sin embargo, en los tres tiempos de medición sí observé un comportamiento estadísticamente diferente entre las muestras, debido a la concentración neutrófila. Es evidente que la diferencia entre los tipos de muestra es grande dado que los valores p obtenidos son muy cercanos a cero. Además, las diferencias aumentan significativamente con la concentración leucocitaria, pero no con el paso del tiempo.

Con el objetivo de conocer si existe una relación entre la formación de formazan y la concentración leucocitaria, se co-cultivaron los espermatozoides con tres concentraciones distintas

de neutrófilos. Observé que si existe diferencia en la formación de formazan para las diferentes concentraciones de neutrófilos probadas (Figura 17), esto es cierto tanto para el control como para el test (Friedman y Dunn ($p = > 0.05$), y Wilcoxon ($p = > 0.05$)).

Figura 17. Formación de formazan variando la concentración neutrófila y su relación con el tiempo.



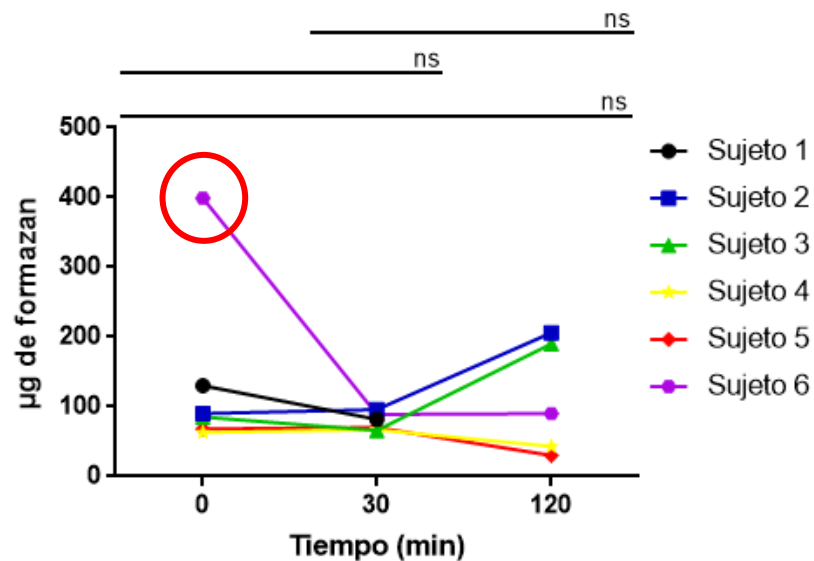
NS: no significativo ($p = > 0.05$), S: significativo.

Se observa que los μg de formazan sí cambian significativamente al aumentar la concentración neutrófila. El R^2 obtenido, sugiere una tendencia lineal entre la formación de formazan y la concentración neutrófila, por lo que es probable que conforme aumente la concentración de neutrófilos, también aumenten los μg de formazan.

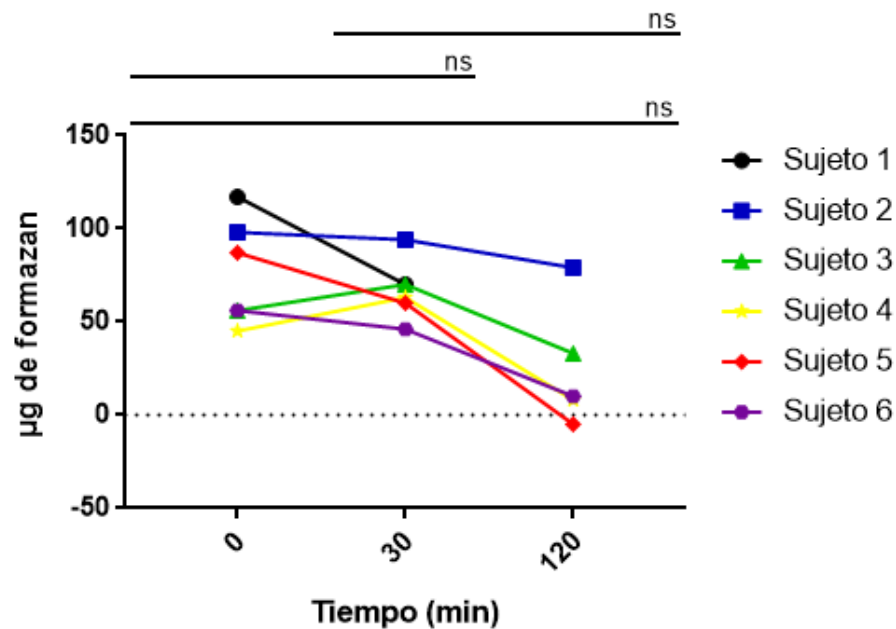
Con el objetivo de conocer si existe una relación entre la formación de formazan y el paso del tiempo, se co-cultivaron los espermias con 5 millones de leucocitos por mL, durante 120 minutos. Observé que no existe diferencia en la formación de formazan para el tiempo probado (Figura 18), esto es cierto tanto para el control como para el test (Friedman y Dunn ($p = > 0.05$), y Wilcoxon ($p = > 0.05$)).

Figura 18. Formación de formazan con el paso del tiempo y su relación con el mismo.

A. Formación de formazan en el tiempo (muestras)



B. Formación de formazan en el tiempo (controles)



NS: no significativo ($p > 0.05$), S: significativo.

Encontré que los μg de formazan no cambian significativamente con el paso del tiempo, pero sí cambian significativamente entre el control y el test a los 120 minutos ($p = 0.0313$). Se puede ver un dato atípico en el tiempo cero de las muestras que se comprobó con la prueba

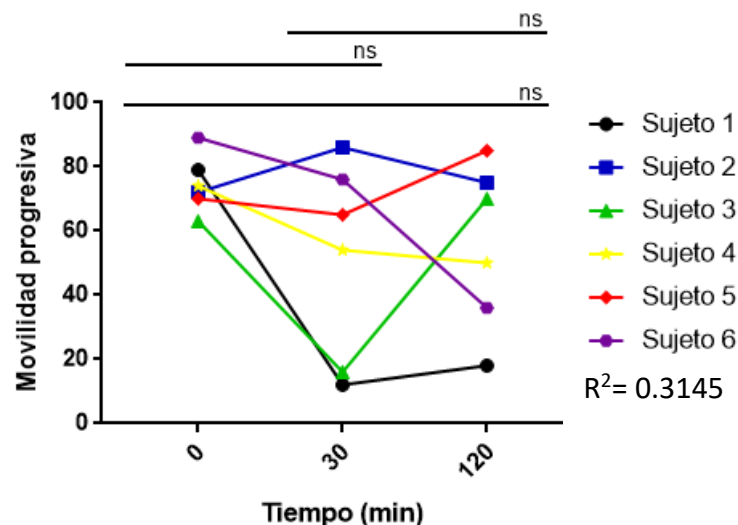
de Grubb's, resultando si ser significativo ($G_p > G_m$) (círculo rojo). Además, el R^2 obtenido sugiere que la relación entre la formación de formazan y el tiempo es cercana a la linealidad, por lo que es probable que conforme el paso del tiempo, también aumenten los μg de formazan. Al comparar la influencia de ambas variables (concentración neutrófila y tiempo) sobre la formación de formazan, se puede afirmar que la concentración neutrófila incrementa más la formación de formazan que el paso de tiempo.

Análisis de la movilidad progresiva, vitalidad, índice de fragmentación de ADN y descompactación cromosómica durante tres tiempos de incubación: 0, 30 y 120 minutos y aumento de la concentración neutrófila (1, 3 y 5 millones/mL).

Con el objetivo de analizar la influencia del tiempo de incubación en las cuatro variables principales: movilidad progresiva (Figura 19), vitalidad (Figura 20), índice de fragmentación de ADN (Figura 21), y descompactación cromosómica (Figura 22) en los espermatozoides, se co-cultivaron 6 muestras de semen con una concentración de 5 millones de espermatozoides por mL y 5 millones de neutrófilos por mL, las cuales fueron evaluadas a los 0, 30 y 120 minutos (Friedman y Dunn, $p = > 0.05$) y comparadas con los controles Wilcoxon ($p = > 0.05$). Los resultados se presentan en las figuras a continuación.

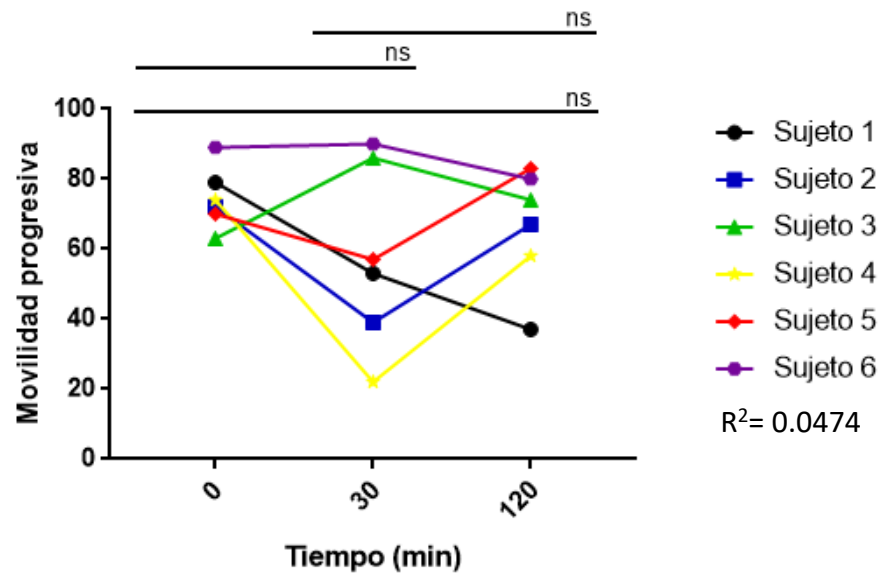
Figura 19. La movilidad progresiva no cambia significativamente con el tiempo, ni hay una diferencia significativa entre las muestras y controles; tampoco existe una tendencia lineal en el tiempo.

A. Movilidad progresiva en el tiempo (muestras)



Continuación Figura 19.

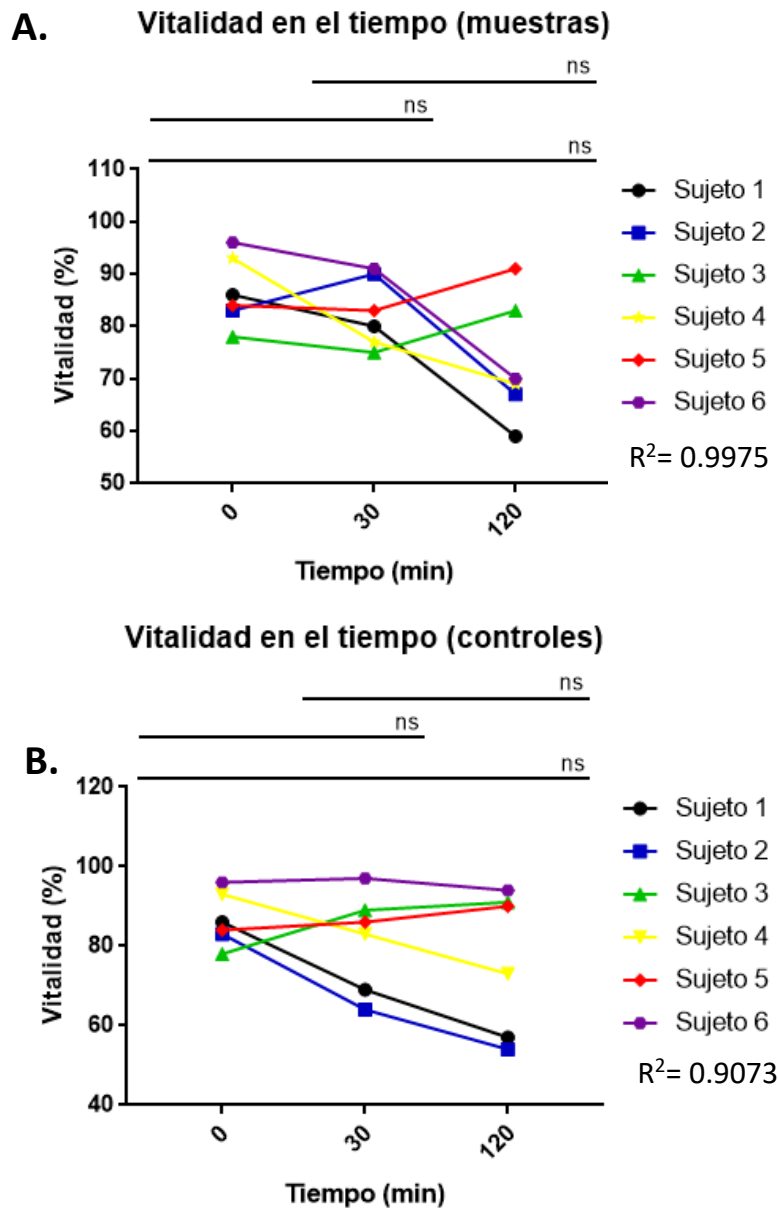
B. Movilidad progresiva en el tiempo (controles)



NS: no significativo ($p > 0.05$), S: significativo.

Se puede observar que la variación de la movilidad progresiva en el tiempo no es significativa, ni al compararla en los 0 y 30 minutos, o en los 30 y 120 minutos; tampoco hay diferencia significativa entre los controles y las muestras, a ningún tiempo. Además, se aprecia mucha variación entre individuos, especialmente a los 30 y 120 minutos, por lo que no es posible generalizar una conclusión siendo una muestra tan pequeña. No existe una relación lineal de la movilidad progresiva con el paso del tiempo.

Figura 20. La vitalidad no cambia significativamente con el tiempo, ni hay una diferencia significativa entre las muestras y controles; pero sí existe una tendencia lineal en el tiempo.



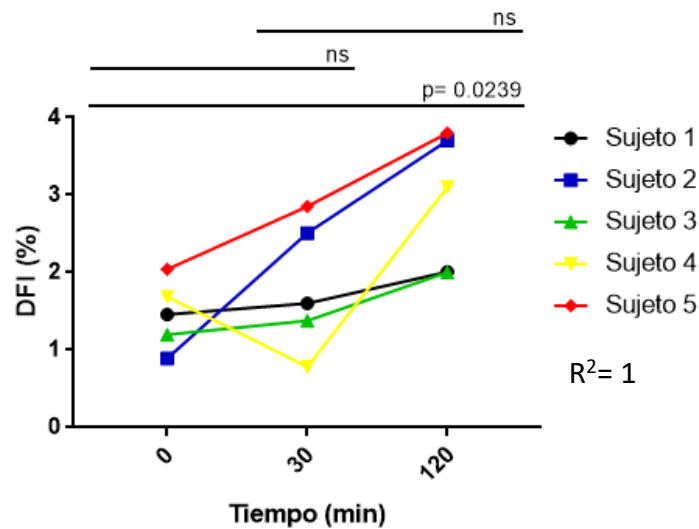
NS: no significativo ($p > 0.05$), S: significativo.

Se puede observar que la variación de la vitalidad en el tiempo no es significativa, ni al compararla en los 0 y 30 minutos, o en los 30 y 120 minutos; tampoco hay diferencia significativa entre los controles y las muestras, a ningún tiempo. Además, se aprecia mucha variación entre individuos, especialmente a los 30 y 120 minutos, por lo que no es posible

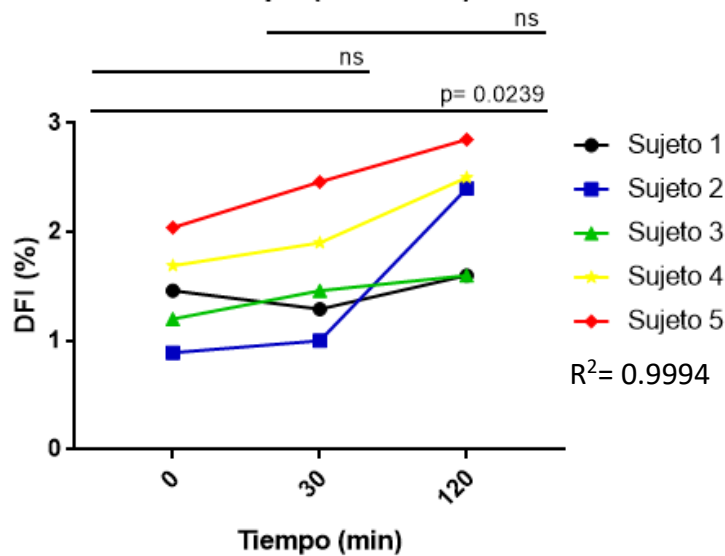
generalizar una conclusión siendo una muestra tan pequeña. Sin embargo, los resultados sugieren que sí existe una relación lineal de la vitalidad con el paso del tiempo.

Figura 21. La fragmentación de ADN aumenta significativamente con el tiempo, también hay una diferencia significativa entre las muestras y controles, y sí existe una tendencia lineal de aumento en el tiempo.

A. Índice de fragmentación de ADN en el tiempo (muestras)



B. Índice de fragmentación de ADN en el tiempo (controles)

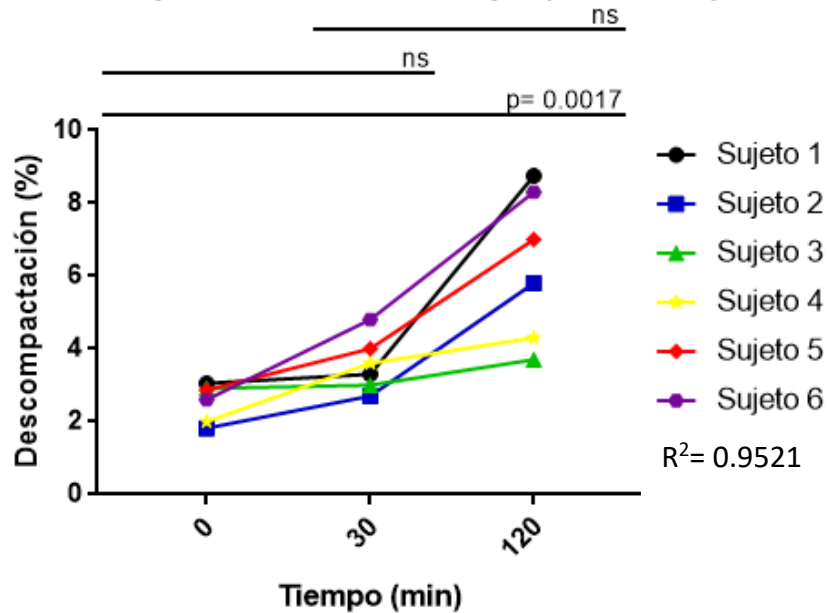


NS: no significativo ($p > 0.05$), S: significativo.

Se puede observar que la variación de la fragmentación de ADN en el tiempo si es significativa, al compararla entre los 0 y 120 minutos; si hay diferencia significativa entre los controles y las muestras ($p= 0.0313$). Además, se aprecia mucha variación entre individuos, por lo que no es posible generalizar una conclusión siendo una muestra tan pequeña. Sin embargo, los resultados sugieren que sí existe una relación lineal de la vitalidad con el paso del tiempo.

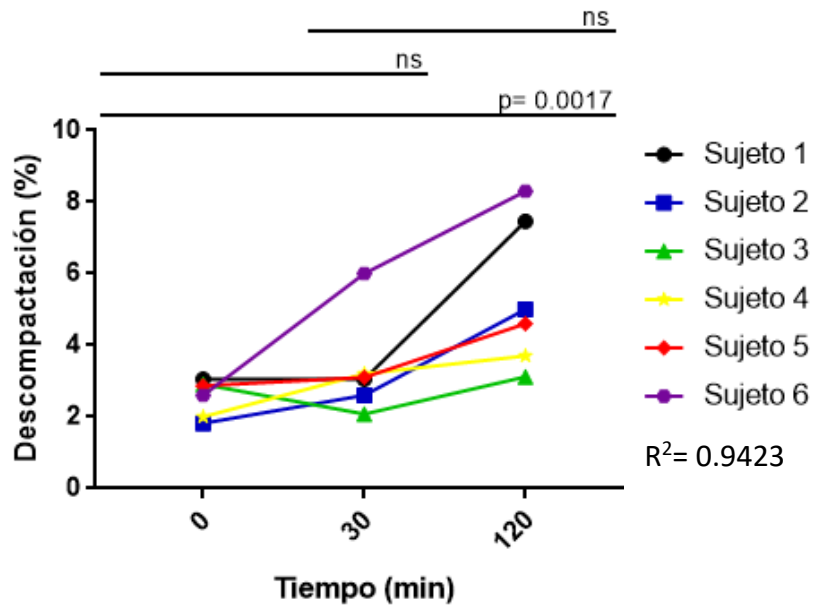
Figura 22. La descompactación cromosómica aumenta significativamente con el tiempo, también hay una diferencia significativa entre las muestras y controles, y si existe una tendencia lineal de aumento en el tiempo.

A. Descompactación en el tiempo (muestras)



Continuación Figura 22.

B. Descompactación en el tiempo (controles)



NS: no significativo ($p > 0.05$), S: significativo.

Se puede observar que la variación de la descompactación cromosómica en el tiempo si es significativa, al compararla entre los 0 y 120 minutos; sí hay diferencia significativa entre los controles y las muestras ($p = 0.0313$). Además, se aprecia mucha variación entre individuos, por lo que no es posible generalizar una conclusión siendo una muestra tan pequeña. Sin embargo, los resultados sugieren que sí existe una relación lineal de la vitalidad con el paso del tiempo.

IV. DISCUSIÓN

Luego de la obtención de una muestra de semen destinada para un tratamiento de reproducción asistida, se suele incubar la muestra a 37°C entre 15 y 30 minutos aproximadamente. Este tiempo garantiza la licuefacción de las seminogelinas contenidas en el semen naturalmente (OMS, 2013). No es posible trabajar con la muestra omitiendo el paso de incubación porque las seminogelinas le otorgan una consistencia gelatinosa y espesa a la muestra. Lo cual dificulta la observación y análisis de los espermias en el microscopio y la toma de alícuotas para su evaluación (OMS, 2013). En una clínica de reproducción asistida es probable que en un día ocupado se acumulen las muestras de semen a ser evaluadas dentro de una incubadora, prolongando su tiempo incubación más de lo necesario. Durante este tiempo, los espermias se ven expuestos a las condiciones oxidantes del ambiente y del propio plasma seminal (Aitken, *et al.* 1999; Athayde, *et al.* 2007). Los principales productores de estos agentes oxidantes, como los ROS, son los leucocitos, especialmente los neutrófilos, y espermatozoides inmaduros (Shulte, *et al.* 2010; Hekmatdoost, *et al.* 2009). Los ROS se encuentran naturalmente en una muestra de semen y son necesarios para una activación espermática adecuada. Sin embargo, se ha reportado que niveles de ROS arriba del límite pueden inducir un aumento en la fragmentación del ADN y/o la descompactación cromosómica (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Iommiello, *et al.* 2015). Además, se han reportado múltiples casos en donde existe una relación directa entre los niveles altos de ROS y la incidencia de casos de infertilidad masculina (Yang, *et al.* 2016; Amarasekara, *at al.* 2012; Curti, *et al.* 2011; Aitken, *et al.* 1999). A pesar de que varios estudios se han enfocado en evaluar la relación entre la concentración leucocitaria y los niveles de ROS (Iommiello, *et al.* 2015; Athayde, *et al.* 2007; Agarwal, *et al.* 2014; Sharma, *et al.* 2001), hasta ahora nadie nunca, a mi conocimiento, ha documentado la relación con el tiempo de incubación previo al trabajo con las muestras. En este estudio fue posible la evaluación de las dos variables más importantes en la generación de ROS en una muestra de semen: concentración leucocitaria y tiempo de incubación. Los resultados reportados sugieren una tendencia sobre el comportamiento general de las variables.

Aislamiento de neutrófilos viables a partir de sangre periférica para co-cultivarlos con espermatozoides

Para optimizar los co-cultivos de espermatozoides y neutrófilos estandaricé el aislamiento de neutrófilos a partir de sangre periférica. Inicialmente, luego de la primera centrifugación, se re-suspendía el botón en 2 mL de solución de cloruro de amonio al 0.87 %, pero el extracto se diluía demasiado por lo que las concentraciones eran demasiado bajas para poder trabajar con ellas. Por esto modifiqué esta sección de la metodología descartando el sobrenadante por decantación y re-suspendiendo el botón en los 500 μ L aproximados que quedaban al fondo del tubo. Esta modificación tampoco resultó efectiva porque la muestra quedaba con demasiados residuos celulares de la lisis de eritrocitos y no resultaba en un extracto puro. Finalmente, se modificó el procedimiento y se trabajó descartando todo el sobrenadante iniciando por decantación y removiendo el resto por aspiración con una micropipeta, para re-suspender el botón restante en 350 μ L de la solución de cloruro de amonio al 0.87 % y garantizar su pureza y concentración necesaria. Esto garantizaría que habría la menor cantidad de contaminación posible por eritrocitos y otros residuos celulares del sobrenadante. En promedio se lograban obtener 3 mL de aislado con una concentración de 6 millones por mL, utilizando esta modificación. Otra modificación a esta parte de la metodología fue que inicialmente trabajaba con la fase L4 (ver Figura 1), pero al evaluarla esta resultó ser solo residuo celular por lo que finalmente trabajé con la L3 que resultó ser la que sí contenía a todos los neutrófilos. De este extracto se hicieron frotos que se tiñeron con Azure A, a pesar de que esta tinción se utiliza regularmente para evaluar morfología espermática. Tradicionalmente los neutrófilos se tiñen con la tinción de Wright (Welsch, 2009), pero aprovechando las propiedades de la tinción Azure A (OMS, 2013) y su disponibilidad en el laboratorio, se utilizó esta. Este frote solo se trabajó en esta fase de la metodología y no en la evaluación de todas las muestras de sangre, porque su utilidad era solo comprobar la efectividad de la extracción y verificar la identidad celular.

Por otro lado, las concentraciones celulares encontradas en el extracto solo fueron aproximaciones hechas por parte de los investigadores; de manera que se mandó a cuantificar el extracto a un laboratorio clínico por medio de un recuento de blancos (ver Anexo 7). En esta evaluación se puede corroborar nuevamente que la mayoría de células eran neutrófilos,

que era el resultado esperado (Kovalski, *et al.* 1991). Además, reveló que, si existe contaminación de los demás tipos de leucocitos, pero este resultado se tomó como normal dado que en condiciones fisiológicas ocurre de la misma manera (Welsch, 2009).

Una vez logré estandarizar el aislamiento de neutrófilos, procedí a evaluar su viabilidad, luego de ser aislados, cuantificando su actividad metabólica mediante la tinción de *orto*-toluidina. Esto lo hice para verificar que las células aisladas no se hubieran dañando durante su aislamiento. Mediante este ensayo evalué la actividad de la peroxidasa (OMS, 2013). Inicialmente encontré un 15 % de células teñidas por campo, que fue mucho menor de lo que se esperaba porque la OMS reporta que lo usual en una tinción de *orto*-toluidina es una coloración total. Tras revisar todas las soluciones, fue aparente que la solución salina, que se usa como base para preparación de la solución en este ensayo, estaba parcialmente congelada. Esto pudo haber modificado la concentración de cloruro de sodio en la solución, volviéndola hipertónica para las células y provocando su lisis (Silverthorn, 2008). Además de repetir la solución también la incubé en baño de María a 37 °C por una hora, en lugar de incubar la muestra a temperatura ambiente. Aun así, no se tiñeron el 100 % de las células, lo cual podría ser una variable que podría interferir dado que siempre existiría cierto número de leucocitos inactivos en el cultivo y probablemente aumentarían la concentración de ROS porque no es una variable natural. Se consideró la posibilidad de agregar un paso adicional al protocolo de aislamiento para garantizar trabajar solamente con células viables del medio. El principal candidato fue el ensayo de MACS (separación de células activadas por magnetismo, por sus siglas en inglés) (Adams, *et al.* 2008). Pero, tras una revisión literaria decidí que no lo usaría porque muchos de estos ensayos reportan falsos positivos y una disminución significativa en el tiempo de vida celular (Ricci, *et al.* 2002; Tait, *et al.* 1999; Oostveldt, *et al.* 1999). El tiempo de vida fue una variable fundamental en este estudio dado que la última medición del co-cultivo con espermatozoides era a los 120 minutos y una disminución en la vida celular inviabilizaría las mediciones en el tiempo.

Pruebas iniciales de movilidad y vitalidad espermática en el tiempo

Consideré la posibilidad de que el sobrenadante del extracto leucocitario tuviera un efecto protector sobre los espermatozoides haciendo que los efectos no fueran evidentes por completo. Para responder este cuestionamiento, decidí hacer un test evaluando la movilidad

progresiva y vitalidad espermática luego del co-cultivo solo con el sobrenadante y solo con el botón del extracto leucocitario. Es posible que la variación espermática que haya provocado el sobrenadante en comparación con el botón fuera tan sutil que no fuera detectable dado el tamaño reducido de muestra; pero que con un número más grande de sujetos evaluados pasara a ser significativamente diferente (Thabane, *et al.* 2010; Murphy, *et al.* 2009). Es probable que algunas proteínas del plasma sanguíneo amortigüen los efectos de la incubación con neutrófilos e inhiban la degradación de ellos (Perumal, 2012; Villa, *et al.* 2008; Vallejos, *et al.* 2003; Twigg, *et al.* 1998). Se recomienda desarrollar un proyecto de investigación para analizar estos cuestionamientos, dado que salen de los objetivos de este estudio.

Porcentaje de fragmentación de ADN espermático (DFI) en el co-cultivo espermático con el extracto leucocitario.

Trabajé la estandarización del uso del kit para evaluar la fragmentación de ADN espermático. Durante este proceso se encontré dos factores que pueden influir en la medición de este parámetro. El primero es la temperatura de la agarosa de bajo punto de ebullición para hacer la fijación de los espermatozoides en la placa. Al someter a los espermatozoides a una temperatura más alta de la debida, estos sufren descompactación severa y al observarse en el microscopio resultan difusos; factor que imposibilita la detección del halo de difusión e impide la determinación del porcentaje de células fragmentadas (Absalan, *et al.* 2012; Shamsi, *et al.* 2011). Una vez corregí esta variable, obtuve los resultados esperados, que eran espermatozoides íntegros con bordes definidos (ver Figura 13). Otro paso fundamental al trabajar con el kit es el tiempo de refrigeración luego de colocar la muestra en el portaobjetos con el cubreobjetos. Recomiendo no refrigerar por más de 10 minutos debido a que es probable que el cubreobjetos se adhiera demasiado a la muestra fijada en el portaobjetos y resulte demasiado difícil remover. Idealmente, el cubreobjetos debería removerse luego de 5 minutos de refrigeración, tiempo suficiente para que se solidifique la muestra. Algo que también vale la pena mencionar es que los leucocitos en la muestra también son reactivos al efecto desnaturalizante del kit y a simple vista parecen cabezas de espermatozoides sin fragmentación. Este es un factor de error importante porque fácilmente se pueden confundir a los neutrófilos con espermatozoides, resultando en que se reporte un porcentaje de fragmentación equivocado (ejemplo visual, Figura 13). Sin embargo, algo bueno de ello es

que confirmó su actividad celular y viabilidad por lo que apoyó la decisión de no utilizar un ensayo como el MACS como paso extra en el asilamiento celular.

Una vez estandaricé el uso del kit para la determinación de la fragmentación de ADN en espermatozoides procedí a evaluar los efectos del tiempo sobre esta variable, y confirmar los mismos sobre la movilidad progresiva y la vitalidad. Las muestras iniciaron con un decremento a los 60 minutos en todos los parámetros y luego un aumento de ellos a los 120 minutos. Es probable que exista una relación entre una concentración baja de ROS con la actividad normal espermática y que, al aumentar los niveles de ROS, los espermatozoides sufran daños por oxidación. El daño espermático debido al aumento de ROS está reportado en múltiples estudios (Agarwal, *et al.* 2014; Aziz, *et al.* 2008; Aitken, *et al.* 1999; Aitken, *et al.* 1992), pero nunca se ha relacionado con el tiempo de incubación. También es probable que tenga relación con el efecto protector de las proteínas del plasma sanguíneo, detectado en los primeros ensayos, donde al inicio sea suficiente para limitar el daño, pero con el paso del tiempo deje de serlo; similar a como sucede con el plasma seminal (Perumal, 2012; Villa, *et al.* 2008; Vallejos, *et al.* 2003; Twigg, *et al.* 1998).

Por otro lado, logré detectar que el efecto en la vitalidad y la movilidad progresiva es limitado (dado que no encontré diferencias significativas), pero el DFI se ve mucho más afectado igual que como reportan Aitken, *et al.* 1995; Saleh, *et al.* 2002; Henkel, *et al.* 2003; y Darmawan, 2007. Probablemente esto se deba a que inicialmente los efectos no son tan evidentes a nivel macroscópico (movilidad y vitalidad), pero si a nivel microscópico (DFI y descompactación) y es hasta luego de varias horas que logran apreciarse realmente los efectos perjudiciales en todos los parámetros de medición. En relación con esto es que decidí elegir los tiempos de medición de ROS, siendo 0, 30 y 120 minutos para poder ver el inicio del cambio en las variables. También, en todas evaluaciones se observó más o menos la misma relación entre el test y el control, en donde el test tuvo resultados más severos sobre los espermatozoides; confirmando el efecto detrimental reportado que tienen los neutrófilos sobre la actividad espermática (Lobascio, *et al.* 2014; Mupfiga, *et al.* 2013; Tunc, 2010; Fraczek, *et al.* 2005; Saleh, *et al.* 2002; Whittington, *et al.* 1999).

Evaluación visual de la concentración de ROS en las muestras

La oxidación del NBT resulta en la formación de un compuesto llamado formazan que

tiene una coloración característica azul oscuro (Iommiello, *et al.* 2015; Lipshultz, *et al.* 2009). De manera que entre más intensa sea la coloración del botón formado, mejor indicativo será de una concentración más alta de ROS en las células de la muestra. Decidí evaluar visualmente la coloración de los botones generados debido al comportamiento inusual observado en la cantidad de formazan formado en los controles y el comportamiento extraño de las muestras con el paso del tiempo. Los resultados confirmaron lo reportado en la tesis doctoral de Tunc en el 2010 en donde relaciona directamente la concentración de formazan con el aumento de la concentración leucocitaria. Como es evidente en la Figura 7, las muestras que tenían más leucocitos fueron las que presentaron una coloración más intensa, indicando una relación directa entre la concentración de leucocitos y la intensidad del color. Existen reportes (Iommiello, *et al.* 2015; Curti, *et al.* 2011; Amarasekara, *et al.* 2012) en donde cuantifican la concentración de ROS en la muestra utilizando solamente una escala visual o colorimétrica del botón, pero este estilo de evaluación genera resultados subjetivos por lo que para este estudio decidí medir las absorbancias espectrofotométricas generadas para poder reportar resultados más objetivos. Aun así, es posible que las absorbancias variaran por algunos factores externos como la presencia de pequeñas burbujas en la placa de ELISA generadas a partir de la deposición de la muestra, luz parásita del exterior o contaminación externa de polvo o partículas microscópicas de saliva (Skoog, *et al.* 2005). Es poco probable que estos factores, aun actuando todos juntos, desviaran las absorbancias de una manera transcendental como lo que se aprecia en los resultados, pero probablemente si contribuyeron un poco. Además, este patrón que se observó desde las primeras pruebas del estudio, por lo es poco probable que se deba a un error humano.

Medición de ROS según el tiempo de incubación (0, 30 y 120 minutos) y según la concentración leucocitaria en la muestra (1, 3 y 5 millones de neutrófilos por mL).

Con el fin de evaluar el comportamiento desigual discutido anteriormente decidí modificar la metodología. Originalmente no realicé los lavados con PBS y DMSO en KOH 2M, sino que el equipo leía las absorbancias directamente con el reactivo (Kovalski, *et al.* 1991). Al hacer esto no solo se estaba midiendo el formazan intracelular, sino también el extra celular que no había reaccionado; resultando en datos erróneos y absorbancias más altas de lo que realmente producían las muestras (Amarasekara, *et al.* 2012 y Yang, *et al.* 2016).

Solo trabajé dos muestras con la metodología original por esta misma razón. Al agregar esta modificación las absorbancias disminuyeron un poco, pero el comportamiento persistió, por lo que descarté la posibilidad de que este comportamiento se debiera a una mala técnica o a un protocolo equívoco. Es posible que el comportamiento persistiera debido a la influencia de factores independientes de cada sujeto como estrés, alimentación, ejercicio, mutaciones genéticas y anormalidades cromosómicas que también pueden alterar el funcionamiento normal de los procesos bioquímicos (Shulte, *et al.*, 2010). Iommiello, menciona en el 2015 que factores como obesidad, alcoholismo, tabaquismo, infecciones genito-urinales y algunas otras condiciones también pueden afectar, pero estas últimas son poco probables dado que se trabajó solo con sujetos sanos y con estilo de vida saludable. Recomiendo que, para futuros estudios, estas variables se controlen en la medida de lo posible. También recomiendo que se revise la concentración de neutrófilos en el extracto de sangre periférica siempre porque esta puede variar fácilmente por la influencia de factores externos como desvelo, estrés, consumo de alcohol o dieta (Cavagna, *et al.* 2012).

Una vez estandaricé la metodología elaboré una curva de calibración. Para esto estimulé la formación de formazan solo con neutrófilos. No utilicé espermatozoides para ello porque se ha reportado muchas veces que su contribución a la oxidación es mínima (Tunc, 2010). El comportamiento observado en la formación de formazan para las muestras ML5 y ML1 es similar al observado en la movilidad progresiva. Nuevamente, se trata de un comportamiento no esperado ya que la concentración de ROS en la muestra debería incrementar con el tiempo constantemente, según lo reportado (Lobascio., *et al.* 2015; Mupfiga; *et al.* 2013; Tunc, 2010; Fraczek, *et al.* 2005; Saleh, *et al.* 2002; Whittington, *et al.* 1999). En el caso del control negativo, este comportamiento si era el esperado ya que no se formó formazan. Aun así, se aprecia un declive en la curva en el minuto 30 lo cual se puede atribuir solamente a la degeneración del reactivo en sí ya que el control negativo contenía solamente PBS y NTB al 0.1% por lo que no hay otra posible explicación. La generación no constante de formazan durante el tiempo en los controles tampoco era el comportamiento esperado. Según lo reportado en los estudios mencionados anteriormente (Lobascio., *et al.* 2015; Mupfiga; *et al.* 2013; Tunc, 2010; Fraczek, *et al.* 2005; Saleh, *et al.* 2002; Whittington, *et al.* 1999), la concentración de ROS tiene una relación directa con la concentración leucocitaria por lo que la muestra con los valores más altos debería haber sido la CL5, seguida

de la CL3 y la CL1. Otro comportamiento inesperado fue la generación de formazan en el CS en comparación con los controles leucocitarios. Según lo reportado en la tesis doctoral de Tunc en el 2010, la concentración de ROS generada por espermias es insignificante comparada a la producida por los neutrófilos, pero en este estudio se observa una disminución de ROS generadas en el tiempo por parte del CS y en el tiempo 0 y 30 resulta ser incluso mayor que las generadas por la CL1. Estos no se consideran valores esperados y probablemente se trate de incongruencias en el comportamiento de esas variables, debido al tamaño de muestra reducido. Es probable que, si se aumentara el número de donantes, se obtendrían resultados más concluyentes (Thabane, *et al.* 2010; Murphy, *et al.* 2009).

Por otro lado, evalué la relación de la formación de formazan con el tiempo y con la concentración leucocitaria dado que esta última es una variable natural en las muestras de semen. Al conocer esta variación se podría saber qué muestras son más propensas a generar ROS, basándose solo en la concentración leucocitaria. De igual manera reveló el mismo resultado y comprobó la influencia del co-cultivo con el extracto leucocitario. En los demás tiempos de medición también se comprobó el mismo efecto. La aparición de datos atípicos puede deberse a una variedad de factores, pero en este caso lo más probable es porque existieron complejidades en la relación entre las variables que no se lograron identificar (Livingstone, 2009). Al evaluar visualmente las medianas de los ensayos en el gráfico (Figura 18), es evidente que la cantidad generada de formazan disminuye drásticamente después del tiempo 30 y en el tiempo 120 aumentan de nuevo, similarmente a como sucedía con la movilidad progresiva. Nuevamente, este comportamiento no es típico para la variable ya que según lo reportado la concentración de ROS en el tiempo aumenta progresiva y constantemente; como se menciona previamente (Lobascio., *et al.* 2015; Mupfiga; *et al.* 2013; Tunc, 2010; Fraczek, *et al.* 2005; Saleh, *et al.* 2002; Whittington, *et al.* 1999).

También logré comprobar una diferencia entre las muestras o controles en todos los tiempos, por lo que otra vez se corroboran los reportes de la influencia leucocitaria en el co-cultivo espermático, discutidos en párrafos anteriores. Por último, el coeficiente de correlación (R^2) obtenido sugiere que si existe una relación lineal entre la formación de formazan y la concentración leucocitaria. También que existe una relación lineal con el paso del tiempo, pero resulta evidente que la concentración leucocitaria tiene más influencia

perjudicial en el co-cultivo espermático que el tiempo de incubación. Es decir que, una muestra que presente concentraciones altas de leucocitos debe ser analizada primero en el laboratorio, mientras que una muestra con concentraciones bajas o nulas de neutrófilos puede analizarse posteriormente. De igual manera, se recomienda procesar las muestras de semen lo más pronto posible, después de su licuefacción, para evitar que su incubación se prolongue, y priorizando las que presenten mayor concentración leucocitaria para evitar los efectos nocivos de los ROS.

Análisis de la movilidad progresiva, vitalidad, índice de fragmentación de ADN y descompactación cromosómica durante tres tiempos de incubación: 0, 30 y 120 minutos y aumento de la concentración neutrófila (1, 3 y 5 millones/mL).

Que no encontrara una diferencia significativa en el tiempo para la movilidad progresiva es contrario a lo que está reportado en la literatura (OMS, 2015; Agarwal, *et al.* 2008; Aitken, *et al.* 1995) ya que la movilidad progresiva debería disminuir con el tiempo. Sin embargo, si disminuyó en las pruebas preliminares que hice de movilidad y vitalidad, lo cual podría indicar que sí existe una disminución, pero no en períodos de incubación tan cortos. En congruencia con esto, el coeficiente de correlación obtenido también sugiere que la relación entre las variables está muy lejana a ser lineal, similar a lo que se había obtenido en pruebas anteriores. No se observó una correlación entre la disminución de la movilidad progresiva en el tiempo. La ausencia de una diferencia del control con el test en todos los tiempos no era lo esperado dado que no muestra el efecto negativo del co-cultivo con el extracto leucocitario espermático reportado (Lobascio, *et al.* 2015; Mupfiga; *et al.* 2013; Tunc, 2010; Fraczek, *et al.* 2005; Saleh, *et al.* 2002; Whittington, *et al.* 1999).

Como se discutió previamente, el comportamiento atípico en la movilidad progresiva se observó desde las primeras pruebas con las muestras y se consideraba la posibilidad de un efecto protector del plasma sanguíneo, principalmente porque muchas de las enzimas protectoras del plasma seminal son de origen sanguíneo (Perumal, 2012). Este factor es algo que vale la pena volver a mencionar ya que es una variable incontrolable. Al extraer los leucocitos de la sangre periférica estos se purifican lo más posible, pero pudo haber existido algo de contaminación residual eritrocítica durante su extracción. Los contaminantes probablemente fueron solo residuos celulares o fragmentos de eritrocitos restantes. Existe la

posibilidad de que estas proteínas protejan a los espermias inicialmente y logren mantenerla en los primeros minutos, pero al llegar el minuto 120 la protección deje de ser tan eficiente y los espermatozoides se vean completamente expuestos al daño por ROS, aumentando progresivamente debido a la pérdida de la capacidad antioxidante que le otorgaban (Perumal, 2012; Aitken y Roman, 2009; Villa, *et al.* 2008; Vallejos, *et al.* 2003; Twigg, *et al.* 1998). Por otro lado, el exceso de eritrocitos también significa exceso de hierro en el medio, lo cual está reportado como un catalizador metálico para la propagación del ciclo oxidativo dañino de los ROS en los ácidos poliinsaturados de los espermatozoides (ver Figura 4, Aitken, 1999). Por lo que recomiendo que en futuras investigaciones se filtre el extracto leucocitario al menos una vez más para poder eliminar la contaminación por eritrocitos lisados.

Los neutrófilos y los macrófagos constituyen hasta un 95% de los leucocitos seminales (Cavagna, *et al.* 2012) y estos naturalmente generan radicales libres (Aitken, *et al.* 2013). La presencia de ellos resulta en una sobre producción de citoquinas, que da lugar a la generación de especies oxidativas, especialmente durante su aislamiento (Cavagna, *et al.* 2012; Robinson, *et al.* 2012; Edmund, *et al.* 2014) por lo que es probable que las observaciones que reportamos hayan sido exageradas por una presencia exagerada de ROS, generados durante la extracción de los neutrófilos. También es posible que durante las centrifugaciones para su extracción las células sufrieran daños o estrés y generaran toxinas que normalmente no generarían, dañando a los espermatozoides (Edmund, *et al.* 2014).

La tolerancia que pueda o no tener una muestra de semen hacia los efectos detrimentes de los ROS depende en gran medida a la capacidad antioxidante que este tenga. Esta propiedad se la otorga la variedad y concentración enzimática que tenga su plasma seminal. En este están contenidas enzimas de origen sanguíneo y de origen seminal, fructosa, co-factores, células inmunitarias, entre otras cosas. La combinación de la acción de ambos tipos de enzimas protege a los espermatozoides de los daños por oxidación (Perumal, 2012). La presencia o ausencia y la concentración de ellas está determinada por factores hereditarios, estilo de vida, alimentación y otras subjetividades, por lo que la capacidad de antioxidante de cada eyaculado depende completamente de la persona y no de las circunstancias (Perumal, 2012; Villa, *et al.* 2008; Vallejos, *et al.* 2003; Twigg, *et al.* 1998). Algunos autores han reportado que es conveniente la suplementación de muestras para tratamientos de

reproducción asistida con ketotifeno (Oliva y Multigner, 2006), con minerales como selenio, cobre, zinc o manganeso porque actúan como co-factores enzimáticos de las dos principales enzimas: glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Sierens, *et al.* 2002; Hughes, C. *et al.* 1998) o con oxidantes como vitamina c (Edmund, *et al.* 2014).

Algo que también vale la pena mencionar es la ausencia del plasma seminal durante el análisis de las muestras. Durante la capacitación espermática la muestra de semen es lavada varias veces y se seleccionan, por medio de gradientes de densidad, a los mejores espermatozoides según su capacidad de nado (OMS, 2013). Mediante este procedimiento los espermatozoides son removidos no solo de contaminantes celulares, células inmunitarias, y células muertas, sino también de todo el plasma (Perumal, 2012; Villa, *et al.* 2008; Vallejos, *et al.* 2003; Twigg, *et al.* 1998) cosa que le otorga su capacidad antioxidante. Dado que no se ha reportado aún un procedimiento mediante el cual se puedan remover solamente las células del sistema inmune sin remover el plasma seminal del semen, se utilizó un cultivo *in vitro* para simularlo. En este, los espermatozoides fueron co-cultivados con los neutrófilos. Solo mediante este procedimiento se podía asegurar que los únicos factores influyendo en el comportamiento de las variables evaluadas (movilidad progresiva, vitalidad, DFI y descompactación) eran la concentración de neutrófilos y el tiempo de incubación. Se ha reportado (Perumal, 2012; Villa, *et al.* 2008; Vallejos, *et al.* 2003; Twigg, *et al.* 1998) que el plasma les confiere propiedades antioxidantes a los espermatozoides, por lo que los efectos de los ROS son menos severos; y cabe resaltar que en condiciones fisiológicas y de laboratorio, los espermatozoides siempre están contenidos dentro de su plasma. Actualmente es imposible generar un plasma seminal artificial que imite las propiedades del plasma natural; de manera que lo más cercano a ello fue lo que se generó en el esquema de trabajo de este estudio.

Otro factor que también pudo haber afectado fue la selección de espermatozoides. Como se mencionaba anteriormente, al capacitar una muestra de semen solo se eligen a los mejores espermatozoides. Naturalmente, una muestra está compuesta por todo tipo de espermatozoides en mayor o menor medida dependiendo de cada persona. Al utilizar solo los mejores espermatozoides para las pruebas se incurrió en un sesgo inevitable. Era inevitable porque la capacitación espermática es la única forma de remover todos los espermatozoides inmaduros o muertos y leucocitos contenidos en la muestra. Dado que la concentración

leucocitaria era una variable de evaluación, no era posible omitir ese paso. Probablemente, los espermias seleccionados tienen efectos menores o logran resistir más el daño por oxidación porque son los más resistentes, en comparación con una mezcla de semen normal que si tiene espermatozoides de todo tipo. Los espermatozoides que usé para esta investigación probablemente generaron resultados atenuados (Aitken y Roman, 2009).

Por otra parte, en el caso de la vitalidad el comportamiento si fue de disminución ligera con el paso del tiempo, como reporta la OMS en su manual de manejo de muestras de semen, pero no lo suficiente para ser significativo durante el tiempo. Esto probablemente debido a que el número de muestra fue pequeño. Debido a que se trata de una disminución tan sutil, este cambio en el tiempo no fue significativo, aun siendo apreciable a simple vista, pero probablemente se deba a que es una muestra pequeña de la población y si se aumentara el número de donantes posiblemente si sería significativo. A pesar de ello, se observó que con el paso el tiempo la vitalidad disminuirá. Esto también resultó evidente en el cultivo inicial de 24h donde al finalizar la vitalidad era de 85 (ver Figura 12A). Vale la pena resaltar que incluso luego de 24 horas de incubación la vitalidad espermática sigue siendo alta; demostrando que este parámetro es el más resistente a los efectos en el tiempo.

Asimismo, para el DFI y la descompactación cromosómica el comportamiento observado en el tiempo fue de aumento constante en ambos, lo cual coincide con el coeficiente de correlación encontrado que sugería que la relación entre el DFI/descompactación y el tiempo era probablemente lineal. Este comportamiento también lo reportaron muchos otros autores (Aitken, *et al.* 1995; Saleh, *et al.* 2002; Henkel, *et al.* 2003; Darmawan, 2007) que de igual manera afirmaban un aumento en el tiempo. Además, también se demostró el efecto perjudicial que tiene el co-cultivo de los espermatozoides con el extracto leucocitario. Algo importante es que, dado que se trata de parámetros de análisis genético, por más pequeño que sea un aumento, aunque no sea significativo, este podría resultar en efectos severamente perjudiciales en la calidad genética de un embrión, en caso fuera fecundado con un espermatozoide dañado (Enciso y Wells, 2013; Zidi-Jrah, *et al.* 2016; Iommiello, *et al.* 2015) porque podría resultar en un cigoto con problemas genéticos.

Yang, *et al.* 2016; Amarasekara, *at al.* 2012; Curti, *et al.* 2011; y Aitken, *et al.* 1999 reportaron un comportamiento contrario al de este estudio en cuanto a la movilidad

espermática y vitalidad. Ellos reportaron que los parámetros se comportaron constantes el tiempo: ya sea disminuyendo o aumentando, pero no fluctuando entre aumento y disminución; contrario a como yo encontré a la movilidad progresiva y vitalidad que si fluctuaban. Aun así, resulta evidente que la vitalidad y la movilidad progresiva parecen no cambiar significativamente con el tiempo, mientras que el DFI y la descompactación sí. Es probable que esto haya resultado así porque la movilidad es la variable que muestra el cambio más vacilante en el tiempo, en comparación con las otras tres variables. Por lo que se puede concluir que la movilidad progresiva no es un parámetro de elección confiable porque fluctúa demasiado en el tiempo.

Otra cosa importante es que la vitalidad si podría ser un factor determinante en la elección de un espermatozoide para un tratamiento de alta complejidad, pero la movilidad progresiva no porque en pacientes con baja movilidad usualmente se recomienda a ellos optar por un ICSI en donde el espermatozoide es seleccionado manualmente y no necesita nadar hacia el óvulo (OMS, 2013). El utilizar solamente los parámetros tradicionales de evaluación espermática podría resultar en la elección de un espermatozoide aparentemente íntegro, pero genéticamente dañado y repercutir en una baja capacidad fecundativa o un cigoto con desarrollo embrionario pobre. Muchos otros autores han sugerido la inclusión de la evaluación de parámetros genéticos en los espermogramas rutinarios (Hekmatdoost, *et al.* 2009; Absalan, *et al.* 2012; Bungum, 2011; Shulte, *et al.*, 2010; Kim, *et al.* 2013; Shamsi, *et al.* 2011; Athayde, *et al.* 2007; Iommiello, *et al.* 2015), precisamente por las mismas razones. Algo que también vale la pena resaltar es que la vitalidad es la variable que tiene menos cambio en el paso del tiempo en comparación con las demás. Es decir, que los demás parámetros podrían verse afectados con el paso del tiempo, pero aun así no resultaría evidente en la vitalidad espermática. Esto implica que el daño necesario para realmente provocar muerte celular es mucho más alto de lo que muestran estos resultados, incluso con un tamaño de muestra pequeño. De manera que un esperma sumamente dañado genéticamente podría igualmente ser móvil y vital. Es por ello por lo que no se recomienda basar un análisis espermático solamente en los parámetros macroscópicos sin incluir los genéticos, porque el daño al ADN no resulta evidente ni tiene relación directa con la movilidad progresiva ni la vitalidad.

Al observar las gráficas de las Figuras 21 y 22 se puede ver que el daño genético por oxidación seguramente inicia desde el minuto 0, pero solo resulta detectable hasta el minuto 30 y hasta las 24 horas después genera la muerte espermática (ver Figura 12). Por lo que recomiendo realizar más estudios donde se evalúen nuevamente los efectos nocivos de la oxidación en el tiempo, dado que hasta ahora, a mi conocimiento, este es el primer estudio que reporta una posible relación entre concentración leucocitaria y tiempo de incubación de muestras de semen para tratamientos de reproducción asistida.

En este período, en donde ya existe daño a la integridad genética de la célula, pero aún no es apreciable macroscópicamente es en donde se encuentra el mayor peligro para los tratamientos de reproducción asistida porque la célula podría parecer sana y normal (Absalan, *et al.* 2012; Kim, *et al.* 2013; Tsarev, *et al.* 2009; Aitken, *et al.* 2013; Shamsi, *et al.* 2011; Cavagna, *et al.* 2012; Iommiello, *et al.* 2015), pero no tener ADN en condiciones adecuadas para generar un cigoto saludable. Tal y como reportan Aitken y sus colaboradores en 1999: la oxidación por ROS en los espermatozoides está relacionada a pérdidas gestacionales, aneuploidías y otras enfermedades congénitas por lo que sugiero procesar las muestras de semen para TRAs lo antes posible. De esta manera se podrán evitar los factores externos que exacerbaban el daño genético por oxidación y garantizar una mejor calidad seminífera para los pacientes que opten por un TRA (Aitken y De lullis, 2009).

Algo que es evidente en el análisis de todos los parámetros es la variación que hay entre todos los sujetos. Es evidente que no es un comportamiento que se pueda generalizar, en ninguno de los casos, porque la variabilidad es muy alta. Seguramente al aumentar el tamaño de muestra esto disminuiría un poco y los resultados serían más concluyentes. Con el análisis de más sujetos se podrían concluir valores estadísticamente significativos y reportar resultados menos variables, pero no se recomienda porque a pesar de que en este estudio la muestra poblacional es pequeña, los resultados ya muestran una tendencia y seguramente con una muestra más grande, las tendencias serían las mismas. Las observaciones descritas en esta prueba piloto son aproximaciones y probabilidades, basadas en una $n=6$, que no pretende afirmar o refutar nada (Thabane, *et al.* 2010).

Como ya se mencionó, algunos autores han reportado (Barraud-Lange; *et al.* 2011; Verit, *et al.* 2006; Saleh, *et al.* 2003; Pasqualotto, *et al.* 2000) que existe una relación benéfica

de niveles bajos de ROS en las muestras de semen. Basándome en esto, puedo concluir que la explicación más probable del comportamiento fluctuante mostrado en la generación de formazan sea que inicialmente los espermatozoides estén protegidos por las proteínas y propiedades antioxidantes del plasma sanguíneo restante de la extracción de neutrófilos, pero con el paso del tiempo, este deje de ser suficiente para evitar el daño por oxidación, y resulte en daños a la integridad espermática (Perumal, 2012; Aitken y Roman, 2009; Villa, *et al.* 2008; Vallejos, *et al.* 2003; Twigg, *et al.* 1998). Además de la influencia de la contaminación ertirocítica en el cultivo y el sesgo inevitable en la selección de espermatozoides. Al aumentar la concentración de los ROS estos dañarían principalmente a la integridad del ADN espermático, incluso si estos no se pueden apreciar en los parámetros macroscópicos hasta luego de un período de incubación de al menos 24 horas. Debido a esto la recomendación principal para las personas que manejan rutinariamente muestras de semen para tratamientos de reproducción asistida es que realicen los espermogramas lo antes posible, luego de la licuefacción de la muestra, priorizando a las que tengan una concentración de leucocitos más alta y realizando los análisis pertinentes lo más rápido posible para evitar al máximo la exposición de la muestra a las condiciones oxidantes del ambiente. Finalmente, se concluye que la prueba piloto realizada para la evaluación de la posibilidad de realizar un estudio más grande fue exitosa e incluso con un tamaño de muestra pequeño ya se pueden observar ciertas tendencias; de manera que no se recomienda aumentar el número de muestras a analizar porque probablemente se obtendrían las mismas tendencias.

V. CONCLUSIONES

1. Existe una alta variabilidad de respuesta entre los sujetos, por lo que no es posible generalizar una tendencia.
2. El tiempo de incubación tiene efectos menos perjudiciales sobre la muestra, que la concentración de leucocitos y probablemente inicia inmediatamente luego de su obtención; por lo que no fue posible determinar una concentración o tiempo máximo.
3. El aumento de la fragmentación de ADN y la descompactación cromosómica en el tiempo no es evidente en la movilidad progresiva o la vitalidad.
4. Existe una correlación positiva entre el tiempo con la concentración de ROS, la vitalidad, la fragmentación de ADN y la descompactación, además de una positiva entre la concentración de ROS y la concentración leucocitaria; mientras que no encontré relación entre la movilidad progresiva y tiempos cortos de incubación.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda analizar las muestras inmediatamente luego de su licuefacción y priorizar a las que presenten concentraciones altas de leucocitos.
2. No se recomienda realizar un estudio más grande dado que nuestros datos, a pesar de no ser concluyentes, ya sugieren una relación perjudicial entre la incubación y concentración alta de neutrófilos en muestras de semen.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Absalan, F; Ghannadi, A; Kazerooni, M; Parifar, R; Jmalzadeh, F; Amiri, S. 2012. *Value of Sperm Chromatin Dispersion test in couples with unexplained recurrent abortion*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 29(1): 11-14.
2. Adams, J D; Kim U; Soh, H. 2008. *Multitarget magnetic activated cells sorter*. PNAS. 105(47): 18165-18170.
3. Agarwal, A; Mulgund, A; Alshahrani, S; Assidi, M; Abuzenadah, A; Sharma, R; Sabanegh, E. 2014. *Reactive oxygen species and sperm DNA damage in infertile men presenting with low level leukocytospermia*. Reproductive Biology and Endocrinology. 12(126): 1-8.
4. Aitken, R.; Buckingham, D; West, K; Wu, F; Zikopoulos, K; Richardson, D. W. 1992. *Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors*. J. Reprod. Fert. 94:451-462.
5. Aitken, R; Buckingham, D; Brindle, J; Gomez, E; Baker, G; Irvine, D. 1995. *Andrology: Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma*. Human Reproduction. 10(8): 2061-2071.
6. Aitken, R. 1999. *The human spermatozoon, a cell crisis?*. Journal of reproduction and fertility. 115:1-7.
7. Aitken, R y De luliis, G. 2009. *On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa*. Molecular Human Reproduction. 16(1): 3-13.
8. Aitken, R y Roman, S. 2009. *Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes*. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis: advances y experimental medicine and biology. 396: 154-171.
9. Aitken R; Bronson, R; Smith, T. B.; De luliis, G. N. 2013. *The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies*. Molecular Human Reprod. 19[8]: 475-485.
10. Aitken R; Fisher, H; Fulton, N; Gomez, E; Knox, W; Lewis, B; Irvine, S. 2015. *Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine*. Mole. Reprod and Dev. 47:468-482.
11. Amarasekara, D; Wijerathna, S; Fernando, C; Udagama, P. V. 2012. *Cost-effective diagnosis of male oxidative stress using the nitroblue tetrazolium test: useful application for the developing world*. First International Journal of Andrology: Andrología. 46: 73-79.
12. Athayde, K; Cocuzza, M; Agarwal, A; Krajcir, N; Lucon, A; Srougi, M; Hallak, J. 2007. *Development of Normal Reference Values for Seminal Reactive Oxygen Species and Their Correlation With Leukocytes and Semen Parameters in a Fertile Population*. Journal of Andrology. 28(4): 613-620.
13. Aziz, N y Agarwal, A. 2008. *Evaluation of sperm damage: beyond the World Health Organization Criteria*. Fertility and Sterility. 90(3): 484-485.

14. Barraud-Lange, V; Ponte, J; Ziyayat, A; Pocate, K; Sifer, C; Cedrin-Durnerin, I; Fechtali, B; Ducot, B; Wolf, J. 2011. *Seminal leukocytes are Good Samaritans for spermatozoa*. Fertility and Sterility. 96(6): 1315-1319.
15. Bungum, M. 2011. *Sperm DNA integrity assessment: a new tool in diagnosis and treatment of fertility*. Reproductive Medicine. 2012:1-6.
16. Cavagna, M; Oliveira, J; Petersen, C; Mauri, A; Silva, L; Massaro, F; Baruffi, R; Franco, J. 2012. *The influence of leukocytospermia on the outcomes of assisted reproductive technology*. Biomed Central. 10[44]:1-10.
17. Cuellar, A. 2008. *Aislamiento de células mononucleares, extracción de ADN y Amplificación de genes*. Disponible en: [http://www.acmor.org.mx/cuam/2008/20\)adn.pdf](http://www.acmor.org.mx/cuam/2008/20)adn.pdf)
18. Centers for Disease Control (CDC) and National Institute of Health (NIH). 2006. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. Obtenido de: <https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf> consultado el 4/24/17.
19. Curti, G; Cánepa, M; Cantú, L; Montes, J. M. 2011. *Diagnosis of male infertility: A need of functional and chromatin evaluation*. Cartas Urológicas Españolas. 37(2): 100-105.
20. Darmawan, H. 2007. *Production of ROS and its effects on mitochondrial and nuclear DNA, human spermatozoa, and sperm function*. Medical Journal of Indonesia. 16(2): 127- 133.
21. Edmund, Y; J. Edmund y A. Agarwal. 2014. *Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity*. Fert and Sterl. 102[6]: 1518-1527.
22. Enciso, M y Wells, A. 2013. *Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities*. Human Reproduction. 28(6): 1707-1715.
23. Ethical Guidelines on Assisted Reproductive Techonolgy, NHMRC. 1996. Obtenido de: <https://www.nhmrc.gov.au/guidelines-publications/e28> consultado el 4/12/2017.
24. European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE. 2016. *ESHRE Annual Report*.
25. Foruzan, A; Ghannadi, A; Kazerooni, M; Parifar, R; Jamalzadeh, F; Amiri, S. 2011. *Value of sperm chromatin dispersion test in couples with unexplained recurrent abortion*. J. Assistt. Reprod. Genet. 29: 11-14.
26. Fracsek, M y Kurpisz. 2005. *The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa*. Europe PMC. 59: 523-534.
27. Gardner, D; Weissman, A y Howels, C. 2008. *Textbook of Assisted Reproductive Techonologies: laboratory and Clinical Perspectives*. CRC Press. United Kingdom. 1004 pp.
28. Gavrieliouk, D. y R. Aitken. 2015. *Damage to sperm DNA mediated by reactive oxygen species: its impact on human reproduction*. University of Newcastle. Australia. 868pp.
29. Hekmatdoost, A; N. Lakpour y M. Reza. 2009. *Sperm chromatin integrity: etiologies and mechanism of abnormality, assays, clinical importance, preventing and repairing damage*. Avicenna journal of Medical Biotechnology. 1[3]: 147-160.
30. Henkel R; Kierspel, E; Hajimohammad, M; Stalf; T; Hoogendijk; Mehnert, C; Menkveld, R; Schill, W; Kruger, T. 2003. *DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology*. Reprod Biomed Online. 7:477-484.

31. Hughes, C; Lewis, S. E.; McKelvey-Martin, V. J.; Thomson, W. 1998. *The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity*. Hum Reprod. 13: 1240-1247.
32. ICH. 1996. Guidance for Industry: Q2B *Validation of Analytical Procedures*. Extraído de: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073384.pdf> consultado el 16 de febrero, 2017.
33. Iommiello, V; Albani, E; Di Rosa, A; Marras, A; Menduni, F; Morreale, G; Lia Levi, S; Pisano, F; Levi-Setti, E. 2015. *Ejaculate Oxidative Stress Is Related with Sperm DNA Fragmentation and Round Cells*. International Journal of Endocrinology. 2015 (321901): 1-6.
34. Kim, H; Kang, M; Kim, S; Kyung, S; Kim, H; Ku, S; Kim, S; Moon, S; Choi, Y. 2013. *The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis*. CERM. 40: 23-28.
35. Kovalski N; E. lamirande y C. Gangnon. 1991. *Determination of neutrophil concentration in semen by measurement of superoxide radical formation*. Fertility and sterility. 56[5]: 946-953.
36. Lewis, S. 2008. *Is Sperm evaluation useful in predicting human fertility?*. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility. 134: 31-40.
37. Lipshultz, L; Howards, S; Niederberger, C. 2009. *Infertility in the Male*. 4a edición. Cambridge Medicine. Nueva York. Pp 677.
38. Livingstone, D. 200). *A Practical Guide to Scientific Data Analysis*. John Wiley and Sons. United Kingdom. 358 pp.
39. Lobascio, A. M.; Felici, M; Anibaldi, M; Greco, P; Minasi, M. G.; Greco, E. 2015. *Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa*. Andrology. 3(2): 265-270.
40. Mupfiga, C; Fisher, D; Kruger, T; Henkel, R. 2013. *The relationship between seminal leukocytes, oxidative status in the ejaculate, and apoptotic markers in human spermatozoa*. Systems Biology in Reproductive Medicine. 59(6): 304-311.
41. Murphy, K; Myors, B; Wolach, A. 2009. **Statistical Power Analysis**. 3a edición. Taylor and Francis Group, LLC. Nueva York. Pp 211.
42. Oliva, A. y L. Multigner. 2006. *Ketotifen improves sperm motility and sperm morphology in male patients with leukocytospermia and unexplained infertility*. Fert and Stert. 85: 240-243.
43. Pasqualotto, F; Sharma, R; Nelson, D; Thomas, A; Agarwal, A. 2000. *Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation*. Fertility and Sterility. 73(3): 459-464.
44. Perumal, P. 2012. *Seminal Plasma Proteins*. Nature Precedings. Obtenido de: <https://core.ac.uk/download/pdf/1569974.pdf> consultado el: 3/12/17
45. Ricci, G; Perticarati, S; Fragonas, E; Giolo, E; Canova, S; Pozzobon, C; Guaschino, S; Presani, G. 2002. *Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes*. Human Reproduction. 17(10): 2665-2672.

46. Robinson, L; Ioannis, D; Conner, S; Rajkhowa, M; Miller, D; Lewis, S; Kirkman-Brown, J; Coomarasamy, A. 2012. *The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis*. Human Reproduction. 27(10): 2908-2917.
47. Saleh, N. H. 1995. *Effect of Prostaglandin F~ 2~ on the semen picture of native bulls*. Assiut Veterinary Medical Journal. 33: 201-201,
48. Schulte, R; Ohl, D; Sigman, M; Smith, G. 2010. *Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes*. J. Assistt. Reprod. Genet. 27:3-12.
49. Shamsi, M; S. Nazar y R. Dada. 2011. *Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility*. J. Assist. Reprod. Genet. 28:1073-1085.
50. Sharma, R; Pasquualotto, F; Nelson, D; Thomas, A; Agarwal, A. 2001. *Relationship Between Seminal White Blood Cells Counts and Oxidative Stress in Men Treated at an Infertility Clinic*. Journal of Andrology. 22(4): 575-583.
51. Sierens, J. M. Campbell y A. Leathem. 2002. *In vitro isoflavone supplement reduces hydrogen peroxide induced DNA damage in sperm*. Teratog Carcinog Mutagen. 22[3]:227-234.
52. Silverthorn, D. 2008. *Fisiología Humana: un enfoque integrado*. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 860 pp.
53. Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. 2005. *Fundamentos de Química Analítica*. Cengage Learning. 8ª edición. México D. F. 1065 pp.
54. Tait, J; Smith, C; Wood, B. 1999. *Measurement of Phosphatidylserine Exposure in Leukocytes and Platelets by Whole-Blood Flow Cytometry with Annexin V*. 25(5): 271-278.
55. Tesarik, J. y C. Greco. 1999. *In vitro culture facilitates the selection of healthy spermids for assisted reproduction*. Fertil Steril. 72[5]: 809-813.
56. Thabane, L; Ma, Jinhui; Chu, R; Cheng, J; Ismalia, A; Rios, L; Robson, R; Thabane, M; Giangregorio, L; Goldsmith, C. 2010. *A tutorial on pilot studies: the what, why and how*. Bio Med Central Medical Research Methodology. 10:1.
57. Tsarev, I; Bungum, M; Giwercman, A; Erenpreisa, J; Ebessen, T; Ernst, E; Erenpreiss, J. 2009. *Evaluation of male fertility potential by Toluidine Blue test for sperm chromatin structure assessment*. Human reproduction. 24[7]: 1569-1574.
58. Tunc, O. 2010. *Investigation of the Role of Oxidative Stress in Male Infertility*. PhD Thesis: The University of Adelaide, Australia.
59. Tunc, O; Bakos, H. W.; Tremellen, K. 2010. *Impact of body mass index on seminal oxidative stress*. First International Journal of Andrology: Andrología. 43: 121-128.
60. Twigg, J; Irvine, D S; Houston, P; Fulton, N; Michael, L; Aitken, R J. 1998. *Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma*. Molecular Human Reproduction. 4(5):439-445.
61. Oostveldt, K; Dosogne, H; Burvenich, C; Paape, M J; Brochez, V; Eeckhout, V. 1999. *Flow cytometric procedure to detect apoptosis of bovine polymorphonuclear leukocytes in blood*. Veterinary Immunology and Immunopathology. 70: 125-133.
62. Vallejos, S; López, C; Schulz, M. 2003. *Valores de referencia para superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y estado antioxidante total en sangre y plasma seminal humano*. International Journal of Morphology. P172.

63. Verit, F; Verit, A; Kocyigit, A; Ciftci, H; Celik, H; Koskal, M. 2006. *No increase in sperm DNA damage and seminal oxidative stress in patients with idiopathic infertility*. Archives of Gynecology and Obstetrics. 274(6): 339-344.
64. Vernet, P; Fulton, N; Wallace, C; Aitken, R. 2001. *Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa*. Biology of Reproduction. 65: 1102-1113.
65. Vessey, W; Miranda, A; Macfarquhar, R; Agarwal, A; Homa, S. 2014. *Reactive oxygen species in human semen: validation and qualification of a chemiluminescence assay*. Fertility and sterility. 102[6]: 1576-1583.
66. Villa, N; Moreno, W; Ceballos, A. 2008. *Actividad de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en sangre, plasma sanguíneo y plasma seminal en toros Normando*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 21: 537-545.
67. Welsch, U y Sobotta, J. 2009. *Histología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 676 pp.
68. Whittington, K. 1999. *Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions*. International Journal of Andrology. 22(4): 229-235.
69. World Health Organization. 2013. *WHO laboratory manual for the examination for the examination and processing of human semen*. Estados Unidos. [Publicación en línea] en: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/index.html> [Con acceso el 10-7-2016].
70. Yang, Q; Zhao, F; Hu, L; Bai, R; Zhang, N; Yao, G; Sun, Y. 2016. *Effect of paternal overweight or obesity on IVF treatment outcomes and the possible mechanisms involved*. Natures Scientific Reports. 6: 29787.
71. Zar, J. 2001. **Biostatistical Analysis**. 5a edición. Prentice Hall Inc. Estados Unidos. Pp 984.
72. Zidi-Jrah, I.; Hajlaoui, A; Mougou-Zerelli, S; Kammoun, M; Meniaoui, I; Sallem; A; Brahem, S; Ibala-Romdhane, S. 2016. *Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss*. Fert and Ster. 105:58-64.

IX. ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado

Consentimiento Informado para la donación de semen y sangre

Como parte de mi trabajo de tesis para obtener la Licenciatura en Bioquímica y Microbiología haré un estudio (trabajo de investigación) conjunto entre la Universidad del Valle de Guatemala y Gestar®, un centro privado de fertilidad. Este estudio y consentimiento informado está avalado por el comité de Ética de la UVG. El propósito de este estudio es determinar cómo los leucocitos, también llamados glóbulos blancos, pueden afectar a los espermatozoides. Los resultados de esta investigación servirán para que los laboratorios que se dedican a ayudar a parejas con problemas de fertilidad puedan mejorar la forma en la que procesan las muestras de semen que usan en los tratamientos para mejorar el éxito de los mismos.

Usted está invitado a participar libremente en este estudio. Si desea hacerlo, le solicitaremos una muestra de semen que deberá dar en Gestar® y permitir que recolectemos una muestra de sangre de 12 cc de su antebrazo, además de una gota de sangre de su dedo, que extraeremos en el mismo sitio. Por este procedimiento podrá sentir las molestias usuales que podría experimentar durante un análisis clínico de rutina como formación de hematomas, mareo, somnolencia o dolor al tacto en el área. La duración de su participación en el estudio será del tiempo que tome en dar la muestra de semen más 10 minutos de la recolección de sangre. Deberá esperar una hora en la recepción luego de haber dado sus muestras para que el personal de laboratorio pueda verificar que sean adecuadas para el estudio. Se le notificará personalmente al respecto.

Su aporte para este estudio es completamente anónimo. Al momento de tomar sus muestras estas serán identificadas con un código y el único dato personal que le solicitaremos será su edad. Por su valiosa participación, usted recibirá Q70 en efectivo como compensación por su tiempo y por las molestias que este estudio le pudieran causar. Además, podrá solicitar los resultados de un espermograma de rutina un día después de su donación, solicitándolo al correo laboratorio@gestar.com.gt con el código que se entregará en el momento que ingrese a la clínica.

Al firmar este consentimiento usted no se encuentra comprometido a terminar todas las etapas del estudio y tiene la total libertad de revocar su autorización sin necesidad de explicación alguna y sin ningún castigo, falta de beneficios médicos, o consecuencias negativas para usted. La firma del consentimiento no implica pérdida de los derechos individuales de acuerdo con las leyes de Guatemala.

Los datos y resultados serán almacenados digitalmente en una computadora con usuario y contraseña a nombre del Licenciado Fredy Mejía, dentro de Gestar a la cual solo él tendrá acceso. Los resultados finales serán mantenidos en confidencialidad publicando únicamente los códigos asignados y ningún identificador personal. Si desea conocer los resultados finales del estudio, enviar un correo electrónico a fomejia@me.com a nombre del Licenciado Mejía solicitando los mismos, por lo menos seis meses luego de haber hecho su donación, o consultar la biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala (18 Av. 11-95 zona 15 Vista Hermosa III) a partir del mes de abril 2018. Cualquier duda o consulta relacionada con el estudio o sus derechos correspondientes no dude en comunicarse al correo mencionado anteriormente.

FIRMA DE TESTIGO (en caso el donador sea analfabeto)

He escuchado la explicación de este estudio. Los procedimientos, riesgos, y posibles beneficios fueron explicados al donador. Yo no trabajo con el investigador principal u otra persona que trabaje con él. Confirmando que el donador ha accedido voluntariamente a la participación en este estudio y puede retirarse en cualquier momento que lo desee, sin consecuencias negativas.

Nombre Donador

Firma Donador

Nombre Testigo

Firma Testigo

Nombre Investigador


Firma Investigador

Guatemala, ____ de _____ de 20 ____

ANEXO 2. Protocolo para limpieza en caso de derrame.

PNT-A-001 | FCM | v 3.5 | 1/6/2015

| | | | |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|-----------------|
| Título | Protocolo de desinfección de áreas y limpieza de derrames | | |
| Código | PNT-A-001 | Área | Lab. Andrología |
| Versión | 3.5 | Elaborado por | Fredy Mejía |
| Fecha Aprobación | 1/6/2015 | Aprobado por | Fredy Mejía |



Protocolo de desinfección de áreas y limpieza de derrames

1. Propósito

Mantener el área de trabajo limpia es indispensable antes de cualquier procedimiento. A diferencia de los procedimientos de limpieza que aplican a la mayoría de laboratorios, en las áreas de andrología y embriología debemos usar soluciones que no tengan una toxicidad residual que puedan dañar a los gametos y embriones que se manejan.

2. Términos y abreviaciones

Jabón: Se refiere a una solución al 2% de un detergente no iónico con pH neutro (como Extran, Merck ó No-ion, Weiner Lab)

Alcohol: Cuando mencionemos alcohol hacemos referencia a etanol al 70%

3. Principio del procedimiento

En los laboratorios de andrología y embriología está prohibido el uso cloro, amonio cuaternario y fenoles por su posible efecto embriotóxico. Sin embargo, el procedimiento de limpieza asegura una desinfección adecuada del área y un método seguro para el manejo de derrames de muestras biológicas en el laboratorio (sangre, semen, líquido folicular y medios de cultivo embrionario). **La limpieza de superficies debe hacerse siempre al final del día y después de haber procesado una muestra.**

4. Materiales

- Píseta con **jabón**
- Píseta con agua desmineralizada
- Píseta con **alcohol**
- Toallas gruesas de papel
- Guantes de nitrilo
- Lentes protectores

PNTA-001 | FOM | v 3.5 | 1/5/2015

- Mascarilla

5. Procedimiento para desinfección de superficies

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>6.1. Moje una toalla de papel con jabón y limpie la superficie de trabajo. Después de usarla, tirela en el bote de basura con bolsa roja (desechos biológicos).</p> <p>6.2. Moje otra toalla de papel con agua y limpie todos los restos de jabón de la superficie. Después de usarla, deséchela en la bolsa de basura biológica.</p> <p>6.3. Moje una tercera toalla de papel con alcohol. Pásela firmemente sobre las superficies y deséchela de la misma manera que las toallas anteriores.</p> <p>6.4. Espere a que el alcohol se haya evaporado antes de empezar a trabajar.</p> | <p>Asegúrese de tener puestos los guantes antes de empezar a trabajar.</p> <p>La evaporación del alcohol se puede percibir por el olor y con el sensor de compuestos orgánicos volátiles del filtro de aire.</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
-

6. Procedimiento para la limpieza de derrames

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>6.1. Coloque una toalla de papel seca sobre el derrame hasta que absorba todo el líquido derramado. Vierta alcohol sobre la toalla y déjelo reposar un minuto. Tire la toalla en el basurero de desechos biológicos.</p> <p>6.2. Moje una toalla de papel con jabón y limpie vigorosamente la superficie de trabajo. Después de usarla, tirela en el bote de basura con bolsa roja (desechos biológicos).</p> <p>6.3. Moje otra toalla de papel con agua y limpie todos los restos de jabón de la superficie. Después de usarla, deséchela en la bolsa de basura biológica.</p> <p>6.4. Moje una tercera toalla de papel con alcohol. Pásela firmemente sobre las superficies y deséchela de la misma manera que las toallas anteriores.</p> <p>6.5. Espere a que el alcohol se haya evaporado antes de empezar a trabajar.</p> | <p>Asegúrese de tener puestos los guantes y lentes protectores antes de empezar a trabajar.</p> <p>La evaporación del alcohol se puede percibir por el olor y con el sensor de compuestos orgánicos volátiles del filtro de aire.</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
-

PNTA-001 | FOM | v 3.5 | 1/6/2015

7. Precauciones de seguridad

- Todos los fluidos biológicos deben considerarse como potencialmente infecciosos, por lo que en todo momento debe vestir con el uniforme de cada área, tener los guantes y lentes protectores puestos antes de abrir cualquier frasco y, si tiene pelo largo, tenerlo recogido o debajo de un gorro.

8. Referencias

- Mortimer D and Mortimer ST. Making it work. Chp. 6 in Quality and Risk Management in the IVF Laboratory. 2005. Cambridge University Press. UK. 86-117
- Bento F. Defining Processes and Procedures. Chp. 4 in Quality Management in ART Clinics (Bento F, Esteves S, Agarwal A. eds.). 2013. Springer. USA. 39-48
- Remohí J. et al. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 3ra ed. 2008. McGraw-Hill. España. 378pp

Cuadro 1. Control de versiones

| v | Autor | Aprobada | Anulada | Comentarios |
|-----|-------|-----------|-----------|------------------------------------------------------------|
| 3.5 | FOM | 1/6/2015 | | Nuevo formato: Agregadas secciones de propósito y términos |
| 3.0 | FOM | 5/3/2009 | 1/6/2015 | Se aprueba uso de No-ion como detergente |
| 2.0 | FOM | 28/2/2007 | 5/4/2009 | Primera versión del protocolo formal |
| 1.0 | FOM | 6/5/2006 | 28/2/2007 | Primera versión - guía de limpieza |

ANEXO 3. Criterios para ser donante de semen.

- a. Tener entre 18 y 35 años.
- b. Estar dispuesto a ser examinado para enfermedades venéreas como VIH, sífilis y clamidia.
- c. Abstenerse de contagiarse de enfermedades venéreas.
- d. No padecer ninguna discapacidad médica.
- e. Estar dispuesto a mantener un estilo de vida y dieta saludable.
- f. Conocer aspectos básicos de su historial médico familiar.
- g. No padecer de ningún desorden hereditario.
- h. Transmitir cualquier información relevante respecto a su salud que pueda afectar posteriormente a cualquier embarazo producto de su donación.
- i. Tener una concentración espermática de 50 millones por mL y por lo menos 2 mL de eyaculado.

ANEXOS 4. Número, código y participación de voluntarios.

| No. de sujeto | Código | Participación |
|---------------|--------|-------------------|
| 1 | IMF | Sangre |
| 2 | SYMF | Sangre |
| 3 | R2007 | Sangre y espermas |
| 4 | P2 | Sangre y espermas |
| 5 | R2106 | Sangre y espermas |
| 6 | GM31 | Sangre y espermas |
| 7 | JB001 | Sangre y espermas |
| 8 | VLD3 | Sangre y espermas |
| 9 | BBJ4 | Sangre y espermas |
| 10 | MSPT22 | Sangre y espermas |
| 11 | EDF6 | Sangre y espermas |

ANEXO 5. Instrucciones de kit para medición de fragmentación de ADN espermático.

Instructions for Use of Kit for determination of the DNA Fragmentation level

in spermatozoa (Sperm Chromatin Dispersion, SCD)

【Product Name】

Generic Name: Kit for determination of the DNA fragmentation level in spermatozoa (sperm chromatin dispersion method)

Trade Name: SpermFunc® DNAf

【Packing specification】 40 tests/kit

【Intended use】

The kit is designed to evaluate the DNA intactness in human sperm or other mammals'.

Reproductive tract inflammation, testicle overheating, drugs, smoking, environmental toxins, varicocele, and hormonal factors, may cause DNA damage in sperm. The determination of DNA intactness in sperm can help to better evaluate the ability of fertility in male and predict the outcome of pregnancy in female. Researches show that there have been the correlation between the abnormalities of sperm DNA and the abortion; there have been the significant negative correlation between the quality of embryonic development prior to the implantation in IVF/ICSI and the damage of DNA in sperm; For a couple planning for intrauterine insemination (IUI), if the male partner has a high level of DNA damage in sperm, they shall consider IVF or ICSI, etc.

However, there are some ongoing disputes on the clinical application of the method of determination of DNA fragmentation level in spermatozoa and its significance, pending further study.

【Test principle】

The basis of the test lies in the differential response offered by the nuclei of spermatozoa with fragmented DNA compared to those with their DNA intactness. The controlled denaturation of the DNA followed by the extraction of the nuclear proteins, gives rise to partially deproteinized nucleoids in which the DNA loops expand, forming halos of chromatin dispersion. However, the spermatozoa nucleoids whose DNA is fragmented, either do not develop a dispersion halo or the halo is minimal. In the study of the agreement between the test SCD and the assay of the structure of the spermatozoon chromatin (SCSA), a correlation coefficient was obtained intraclass R: 0.85. The percentage of the average of the differences in the fragmentation indice was 2.16 in favor of test SCD.

【Main compositions】

| | | |
|----------------------------|----------|------------------------------------------|
| Pre-coated slides | 2 boxes | 40 wells (10 pieces/box , 2 wells/piece) |
| Gel with low melting point | 40 vials | 5.6 ml (0.14 ml/ vial) |
| Solution A | 1 vial | 100 ml |

| | | |
|--------------------------|--------|---------------------------|
| Solution B | 1 vial | 100 ml |
| Wright's stain | 1 vial | 20 ml |
| Wright's buffer | 1 vial | 30 ml |
| SCD preservative reagent | 1 vial | 15 ml |
| Glass slide covers | 1 box | 45 pieces (45 pieces/box) |
| Slide barrels | | |

Note: Need to order in dispensation from BRED Life Science Inc.

Note: Components of kit in different batch can be exchangeable in use when they are within the period of validity.

【Storage conditions and duration】

1. Storage conditions:

- 1) The kit is kept at 2 ~ 8 °C in dark place.
- 2) The pre-coated slide can be stored at room temperature and should be kept away from moisture.

2. Period of validity: The kit is kept at 2 ~ 8 °C for 2 years. Once unsealed, the kit would be kept for 58 days at 2-8° C.

【Applicable instruments】

1. Applicable instrument for this kit: General optical microscope

2. Other devices used in the process of operation:

- 1) 2 ~ 8 °C pharmaceutical refrigerator
- 2) -20 °C refrigerator
- 3) 37 °C constant temperature water bath
- 4) 80 °C dried heater or water bath
- 5) Low-speed centrifuge

3. Other materials required but not provided

- 1) Semen collecting device
- 2) 1µl ~ 5µl adjustable micropipettes and some disposable tips
- 3) 20µl ~ 200µl adjustable micropipettes and some disposable tips
- 4) 100µl ~ 1000µl adjustable micropipettes and some disposable tips
- 5) Forceps or hemostats
- 6) Slide barrels
- 7) Qualitative filter paper
- 8) Disposable gloves
- 9) Distilled water
- 10) Semen liquefaction reagent
- 11) Ethanol 70 %, 90 % and 100 %

【Specimen requirements】

1. The sample should be collected after a minimum of 48 hours but not longer than seven days of sexual abstinence by masturbation or sexual intercourse using special condoms. The semen sample must be complete in collection.
2. Fresh semen samples should be liquefied completely prior to testing, or mixed with SCD preservative reagent then stored at -20 °C for testing later.

【Operational Process】

1. Preparation of reagents

- 1) Put the vial that contains gel with low melting point in dried heater or incubation bath, and incubate it for 20 minutes at 80 °C until the gel dissolved completely. Then transfer the tube to a place at 37 °C for use. (After transferred from 80 °C to 37 °C, it should be balanced at least 5 min before use.)
- 2) The room temperature should be adjusted to 20~28 °C prior to testing.

2. Preparation of specimen

- 1) Dilute the semen sample in culture medium or PBS or NS to a concentration of $5\sim 10\times 10^6$ /ml before testing. Both of fresh samples or samples directly frozen in liquid nitrogen may be used.
- 2) The samples which cannot complete testing can be stored in SCD preservative reagent for testing in future (It can be stored for at least 15 days and the testing results are the same with the fresh samples). The method is as follows: dispense 100 μ l of semen to a vial which contains 300 μ l of SCD preservative reagent, mixing thoroughly (It is very important to do so) and be kept at -20 °C or -80 °C. Before testing, the stored samples should be balanced at 37 °C, then count the sperms and dilute the semen sample by NS to a concentration of $5\sim 10\times 10^6$ /ml.

Note: volume of semen (100 μ l): volume of SCD preservative reagent (300 μ l) =1:3, don't increase the proportion of semen optionally (but the proportion of semen can be reduced).

3. Processing

- 1) Dispense 60 μ l of semen samples whose concentration is $5\sim 10\times 10^6$ /ml to the vial of dissolved gel (Make sure that this step is run at 37 °C), mixing thoroughly. Then incubate at 37 °C for use in the following steps.
- 2) Place the pre-coated slide in the fridge at 2 ~ 8 °C for 5 minutes, then immediately dispense 30 μ l of sperm suspension made by step 1 to the wells of pre-coated slide at 37 °C.
- 3) Put the slide cover over the wells of pre-coated slide quickly and gently (Don't press the slide cover and not to make any air bubbles). Then make the gel solidified by leaving the slide at 2~8 °C refrigerator for 5 minutes.
- 4) Remove the slide cover carefully. The method is as follows: push the slide cover toward one side gently until the one end of slide cover goes beyond the pre-coated slide a little (Figure 1). Pinch the edges of the slide cover and remove it horizontally and carefully (Figure 2).

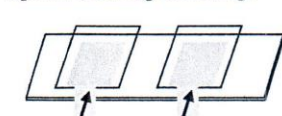


Figure 1

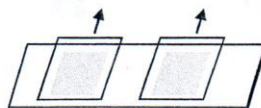


Figure 2

- 5) Introduce the pre-coated slide vertically into a slide barrel containing solution A. Then incubated at room temperature (20 ~ 28 °C) for 7 minutes accurately.

- 6) Pick the pre-coated slide up. Clear the fluid remained on the back and the side of the slide by filter paper (not to touch the well on the slide). Then introduce the slide vertically in another slide barrel of solution B. Then incubated for 25 minutes accurately at room temperature (20 ~ 28 °C).
- 7) Pick the pre-coated slide up. Clear the fluid remained on the back and the side of the slide by filter paper (not to touch the well on the slide). Put the slide horizontally into the tray filled with enough distilled water for 5 minutes. Renew water once or twice during this step.
- 8) Pick the pre-coated slide up. Clear the fluid remained on the back and the side of the slide by filter paper (not to touch the well on the slide). Then introduce the slide vertically in another slide barrel of ethanol 70% for 2 minutes.
- 9) Pick the pre-coated slide up. Clear the fluid remained on the back and the side of the slide by filter paper (not to touch the well on the slide). Then introduce the slide vertically in another slide barrel of ethanol 90% for 2 minutes.
- 10) Pick the pre-coated slide up. Clear the fluid remained on the back and the side of the slide by filter paper (not to touch the well on the slide). Then introduce the slide vertically in another slide barrel of ethanol 100% for 2 minutes.
- 11) Dry the pre-coated slide completely in nature.
- 12) Dispense 15-20 drops of the Wright's stain on the pre-coated slide, and then dispense 30-40 drops of the Wright's butter slowly for staining.
Note: If 15 drops of the Wright's stain are dispensed, the Wright's butter should be dispensed 30 drops. Blow the mixture softly by bulb pipet pump on the slide, and don't destroy the surface tension made by the staining. Fifteen minutes later, rinse the slide softly by distilled water.
- 13) Make the slide air-dried naturally.
- 14) Observe 500 spermatozoa under the General optical microscope with 40× field lens and count the sperms with fragmented DNA.

4. Observation and Calculation

- 1) The identification of DNA fragmented sperm: the head of sperm only produce small halos or not, and the thickness of the halos in one side is less than 1/3 of the smallest diameter of the head of sperm, the sketch maps are as follows (Figure 3):

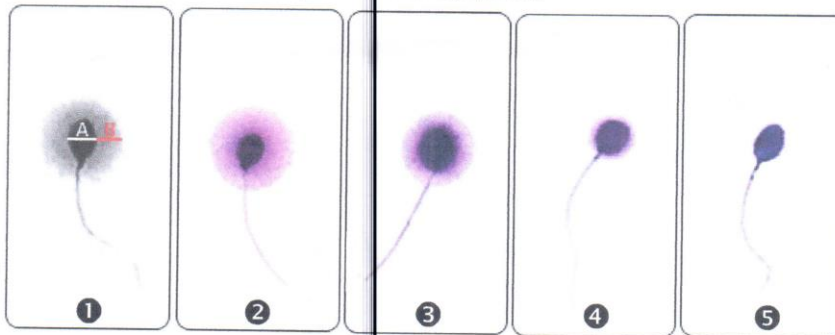


Figure 3

① "A" represents the smallest diameter in the sperm head, "B" represents the thickness of unilateral sperm halo, $B \leq 1/3 A$ indicates the sperm with fragmented DNA. ② ③ represent the sperm without fragmented DNA. ④ ⑤ represent the sperm with fragmented DNA.

2) Percentage of sperms with fragmented DNA = $\frac{\text{Number of sperms with fragmented DNA}}{\text{Whole number of sperms observed}} \times 100\%$;

Percentage of sperms with intact DNA = $1 - \text{Percentage of sperms with fragmented DNA}$.

Note: The whole number of sperms observed should be more than 500.

For example: Count 500 sperms, if the number of sperms with fragmented DNA is 75, the Percentage of sperms with fragmented DNA = $75 \div 500 \times 100\% = 15\%$, and the Percentage of sperms with intact DNA = $1 - 15\% = 85\%$.

【Reference value】

*The normal reference value: the percentage of sperms with fragmented DNA < 25%.

*There are not uniform reference values in clinic at present. The study results which are synthesized from some reports[1~5] about SCD show that the percentage of sperms with fragmented DNA is 12.31 ± 6.31 (~25%), in which the sperms are from 98 fertility males without any distillation.

【Interpretation of test results】

1. The percentage of sperms with fragmented DNA will be higher if the semen sample cannot be in good store (false positive).
2. The percentage of sperms with fragmented DNA will be lower if the reaction time with solution A or B is delayed (false negative).
3. If DNA dispersion halos can be observed in all sperms in one group of semen samples or not, we shall doubt the reliability of the results. Do the test again.

【Limitation of test methods】

Just for manual operation, not for automatic operation yet.

【Performance index of product】

1. Within-run precision: coefficient of variation (CV) $\leq 8\%$
2. Between-run precision: coefficient of variation (CV) $\leq 10\%$

【Precautions】

1. SCD preservative reagent can keep the stability of sperm with fragmented DNA for a period. The amount of semen should be no more than 1/4 whole amount (volume of semen + volume of SCD Preservative Reagent). Be sure to mix thoroughly before storing at -20°C.
2. The room temperature should be adjusted to 20 ~ 28 °C in order to keep the reliability and the stability of the reaction system. This is necessary.
3. Prevent the reagents volatilized and polluted during operation. The solution A and the solution B can be reused for three to five times. And the ethanol 70%/90%/100% can be reused for three times. The used reagents and the unused reagents do not mix together. The used reagents should be given up after using for some times. The above reagents can be

stored in some different slide barrels and directly kept at 2 ~ 8 °C.

4. There will be great changes in every kind of cells in semen after denaturation. It is very hard to differentiate the normal cells from the sperms losing tails. If the size of cell is large and without tail in semen sample, do not regard it as a sperm and count.
5. If all the halos are too small and all the color of them is too thin, it maybe result from the lack of staining or the invalidation of the Wright stain, please restain or use the new Wright stain. If it is hard to differentiate the sperm head and the halo, it may results from the excessive staining, please destain the slide and stain again.
6. There are some thrilled smells in solution B. So we should keep protective isolation from it during operation. Once get touch in skin or eyes with it, please wash with much water or NS or seek for medical treat right away.
7. All the semen samples are regarded as potential infection sources, and all the samples and reagents after testing should be treated as clinical waste, as not to pollute the environment.
8. The kit for determination of the DNA fragmentation level in spermatozoa, in-vitro diagnostic reagents, can only offer the references for the clinic. The clinical practice on patients should be combined with the symptoms and physical signs of patients, other laboratory examination and the medical records, etc.

【References】

1. Gallegos G, Ramos B, Santiso R et al. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. Fertility and Sterility 2008;90(2):328-34.
2. Enciso M, Muriel L, Fernández JL, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. Journal of Andrology 2006;27(1): 106-11.
3. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertility and Sterility 2005;84(4):833-42
4. KAZIM R. CHOCHAN, JEANINE T. GRIFFIN, et al. Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. Journal of Andrology 2006; 27(1):53-59
5. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J. and Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. Human Reproduction 2007; 22:174-9.
6. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price ®, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. Fertility and Sterility 2005; 84:356-64.
7. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Human Reproduction 1999; 14:1039-49.
8. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. Fertility and Sterility 2000; 73:43-50.
9. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay

parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human Reproduction* 2000; 15:1717-22.

10. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kaspersen KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility* 2003; 80:895-902.
11. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility* 2003; 79 Supplement 3:1597-605.
12. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 2006;21:1576-82.
13. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Human Reproduction* 2004; 19:1409-17.
14. Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Human Reproduction* 2005;20:3476-80.
15. Greco E, Romano S, Iacobelli M, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reproduction* 2005; 20:2590-2594.
16. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Human Reproduction* 2003; 18:2082-2088.
17. Keel BA. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertility and Sterility* 2006; 85:128-134.
18. Smit M, Dohle GR, Weber RFA, Romijn H. Sperm DNA damage is associated with impaired spermatogenesis, rather than with post testicular etiologies. *Journal of Andrology* 2006; 71-71.
19. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidans J, Giwercman A. Intraindividual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Human Reproduction* 2006; 21:2061-2064.

【Manufacturer】



BRED Life Science Technology Inc.
7/F, Unit C, Block 10, Huafeng Science & Technology Park, Tangwei St,
Fuyong Subdistrict, Bao'an District, Shenzhen, China;
Post code: 518103
Tel: +86-755-33929737 Fax: +86-755-33929719
Website: www.bredlifesci.com













DongBang AcuPrime (EU) Limited
1 Forrest Units, Hennock Road East, Exeter, EX2 8RU UK


【Date of Approval & Modification】

Date of approval: December, 2010; Date of modification: Not modified

【Explanation of symbols】

| Symbols | Explanation |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|  | Manufacturer |
|  | Authorized representative in the European Community |
|  | Use -by date |
|  | Contents of kit |
|  | Batch code |
|  | Temperature limitation |
|  | Consult instructions for use |
|  | Caution |
|  | <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device. |
|  | Contains sufficient for <n> tests |

ANEXO 6. PNT para determinación de fragmentación de ADN en muestras de semen.

| | | | | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Título | Kit para determinación de fragmentación de ADN en espermatozoides | | | |
| Código | PNT-G-001 | Área | Andrología |  |
| Versión | 1.0 | Elaborado por | Daniela Aparicio | |
| Fecha Aprobación | 18/04/2017 | Aprobado por | Fredy Mejía | |

Kit para determinación de fragmentación de ADN en espermatozoides

1. Propósito

La determinación de la fragmentación de ADN espermático tiene relación directa con la capacidad fecundativa de los espermatozoides. Puede ser causado por obesidad, tabaquismo, drogadicción, varicocele o factores hormonales, entre otros. El objetivo principal del uso de este kit es determinar el grado de fragmentación promedio en una muestra de semen, para relacionarla con sus posibilidades de fecundación y ofrecerle al paciente un mejor tratamiento, según su condición.

2. Términos y abreviaciones

SCD: dispersión de cromatina espermática (por sus siglas en inglés)

ADN: ácido desoxinucléico

Fragmentación de ADN: roturas o lesiones en el ADN que disminuyen su integridad y capacidad fecundativa.

Desnaturalización: cambio estructural de proteínas o material genético que lleva a la pérdida de su estructura nativa y por tanto de su función.

Cromatina: Forma en que se presenta el ADN dentro del núcleo celular

PBS: tampón fosfato salino (por sus siglas en inglés)

NS: solución salina normal 0.9 % (por sus siglas en inglés)

Slide: portaobjetos

3. Principio del procedimiento

Los espermatozoides responden de manera diferente a la tinción dependiendo del grado de fragmentación que presenten. Luego de la desnaturalización controlada del ADN y la extracción de proteínas nucleares, resulta un ADN parcialmente de-proteinizado que da

lugar a su expansión y formación de halos de difusión. Si el ADN del espermatozoide se encuentra fragmentado, no podrá formar halos, o serán mínimos.

4. Materiales y equipos

Muestra

- Muestra de semen fresca o congelada a -80 °C

Suministros

- Kit para determinación de fragmentación de ADN en espermatozoides
- Puntas para micropipetas de 5 µl, 200 µl, y 1,000 µl
- Papel filtro
- Guantes desechables

Equipo

- Microscopio óptico con contraste de fase
- Refrigeradora a 2 °C
- Congelador a -20 °C
- Baño de María a 37 °C y a 80 °C
- Centrífuga
- Micropipetas de 5 µl, 200 µl, y 1,000 µl
- Pinzas

Reactivos

- Agua destilada
- Diluyente para semen
- Etanol 70 %, 90 % y 100 %

5. Procedimientos de calibración

Antes de trabajar asegurar que la incubadora y baño de María estén a las temperaturas correctas.

6. Descripción de la muestra

Muestra de mínimo 5 mL con 10 millones de espermatozoides por mililitro, proveniente de un paciente con 3-5 días de abstinencia sexual, si fiebre en los días anteriores.

7. Procedimiento

- 7.1 Colocar el vial con gel de bajo punto de fusión en un baño de María a 80 °C por 20 minutos, hasta que se disuelva completamente.
- 7.2 Transferir a baño de María a 37 °C por 5 minutos. Este paso es muy importante. Si se agrega la muestra el vial caliente, no va a salir.
- 7.3 Diluir la muestra de semen con el diluyente hasta que alcance una concentración de 5-10X10⁶/mL. Trabajar con la muestra fresca o descongelada. En caso la muestra no se vaya usar inmediatamente: colocar 100ul de semen en el vial con 300ul de reactivo de preservación. Mezclar vigorosamente. Almacenar hasta por 15 días a -20 o -80°C. Al volver a usar, llevar a 37°C y verificar la concentración.
- 7.4 Colocar 60 µl de semen diluido en el vial con gel disuelto a 37 °C. Mezclar. Incubar a 37 °C.
- 7.5 Enfriar los portaobjetos y cubreobjetos en el refrigerador a 2-8 °C por 5 minutos. Inmediatamente después, colocar 30 µl de la suspensión de espermatozoides en el centro del portaobjetos. Es importante enfriar los materiales antes de usarlos, para que el gel solidifique bien y no se escurra.
- 7.6 Colocar el cubreobjetos sobre la muestra rápidamente, cuidadosamente sin dejar burbujas ni presionar. Enfriar en la refrigeradora por 5 minutos más.

- 7.7 Remover el cubreobjetos cuidadosamente, deslizándolo horizontalmente sobre el porta, con cuidado de no remover la muestra, ni dañarla. Tener sumo cuidado de no tocar la muestra durante este procedimiento.
- 7.8 Introducir el slide en un recipiente con la solución A e incubar a temperatura ambiente por 7 minutos exactos. Remover el slide del recipiente y secar con papel filtro la parte de abajo y los bordes. Es muy importante ser preciso en el tiempo de incubación con las soluciones. Tener sumo cuidado de no tocar la muestra durante estos procedimientos de secado.
- 7.9 Introducir el slide en un recipiente con la solución B e incubar a temperatura ambiente por 25 minutos exactos. Remover el slide del recipiente y secar con papel filtro la parte de abajo y los bordes.
- 7.10 Introducir el slide en un recipiente con agua destilada e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos exactos. Cambiar el agua una vez durante este proceso. Remover el slide del recipiente y secar con papel filtro la parte de abajo y los bordes.
- 7.11 Introducir el slide en un recipiente con etanol al 70 % e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos exactos. Remover el slide del recipiente y secar con papel filtro la parte de abajo y los bordes.
- 7.12 Introducir el slide en un recipiente con etanol al 90 % e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos exactos. Remover el slide del recipiente y secar con papel filtro la parte de abajo y los bordes.
- 7.13 Introducir el slide en un recipiente con etanol al 100 % e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos exactos. Remover el slide del recipiente y secar con papel filtro la parte de abajo y los bordes.
- 7.14 Secar el slide completamente con condiciones ambientales.
- 7.15 Colocar 6 gotas del tinte de Wright y 12 del buffer sobre la muestra. Soplar suavemente con una pipeta para mezclar los Tener cuidado de no derramar las soluciones,

reactivos. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y ni romper la tensión superficial sobre la muestra.
lavar con agua destilada.

Secar el slide completamente con condiciones ambientales.

7.16

Observar 500 espermatozoides en el microscopio a 40X y

7.17 contar los que presenten fragmentación.

8. Cálculo de resultados

La cabeza del espermatozoide solo producirá halos si no tiene fragmentación. Entre más pequeños sean los halos, más fragmentado está el ADN. Todavía se toma como fragmentado cuando el halo de un lado de la cabeza es más grande que 1/3 del diámetro más pequeño de la cabeza.

Figura 1.

En la figura se observa: A es el diámetro más pequeño de una cabeza de espermatozoide, B es el grosor de un halo de un lado. Las imágenes 2 y 3 son de espermatozoides sin fragmentación, y las imágenes 4 y 5 son de espermatozoides que si tienen fragmentación.

$$\% \text{ de espermatozoides con ADN fragmentado} = \frac{\text{Número de espermatozoides con fragmentación}}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \times 100$$

% de espermatozoides intactos: 1 - % de espermatozoides con ADN fragmentado

El valor normal de espermatozoides con fragmentación debe ser menor al 25%

9. Fuentes de error

- El kit solo mantiene la estabilidad de los resultados durante un tiempo. Leer los resultados inmediatamente.
- A la hora de almacenar una muestra con el reactivo de preservación, asegurarse de mezclar adecuadamente.
- La temperatura ambiente debe estar entre 20-28 °C. El no hacerlo afecta la estabilidad de la prueba.
- Prevenir que los reactivos se volatilicen o se contaminen durante la operación. Las soluciones A o B se pueden volver a usar de 3-5 veces. Las soluciones de etanol se pueden volver a usar tres veces. No mezclar los reactivos usados con los no usados.
- No tomar en cuenta los espermatozoides que tengan morfología demasiado dañada. Ej.: macrocefalia, doble cola o doble cabeza.

- Si casi no se ve el color y/o los halos son muy pequeños: no se tiñó suficiente, volver a teñir. Si no se puede diferenciar la cabeza del halo: se tiñó demasiado, desteñir y volver a teñir.

10. Intervalo de los resultados reportable

1. El porcentaje de espermatozoides fragmentados será más alto si la muestra de semen no se almacena correctamente o se incuba más del tiempo debido para su licuefacción (falso positivo).
2. El porcentaje de espermatozoides fragmentados será más bajo si el tiempo de incubación con las soluciones A o B se extiende (falso negativo).
3. Si todos los espermatozoides de una muestra se miran iguales – todos fragmentados, o todos sin fragmentación – repetir el test.

11. Interpretación de los resultados

El valor normal debería estar por debajo del 25 %. Nunca reportar 0 % o 100 % de fragmentación.

12. Precauciones de seguridad

- Medidas de seguridad especiales para evitar riesgos físicos, químicos o biológicos.
- No oler, consumir, tocar o entrar en contacto con las soluciones de tinción, especialmente la B. En caso de derrame o contacto, lavar inmediatamente con agua y jabón. En caso de ingesta, conseguir ayuda médica inmediata.
- Descartar las muestras como fuentes potenciales de infección. En ECOTERMO y según las leyes vigentes de Guatemala.


13. Referencias

- Mortimer D and Mortimer ST. Making it work. Chp. 6 in Quality and Risk Management in the IVF Laboratory. 2005. Cambridge University Press. UK. 86-117
- Bento F. Defining Processes and Procedures. Chp. 4 in Quality Management in ART Clinics (Bento F, Esteves S, Agarwal A. eds.). 2013. Springer. USA. 39-48
- Carson, BE. ISO 9001:2000 Clause 4–Quality Management System. Chp. 3 in A New Paradigm for Healthcare. 2004. American Society for Quality, Quality Press. USA. 21-42

Cuadro 1. Control de versiones

| v | Autor | Aprobada | Anulada | Comentarios |
|-----|-------|------------|---------|-----------------|
| 1.0 | FOM | 18/04/2017 | | Primera versión |

ANEXO 7. Resultados de laboratorio para conteo de blancos en extracto leucocitario.

| CORPORACION ULTRALAB | Ingreso: 02/08/2017 | (1,242,018) |
|------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| | Impresión: Viernes, 04 de Agosto de 2017 |  |
| MAIL | Médico: DOCTOR | |
| | Teléfonos: -- | |
| | Paciente: DANIELA APARICIO | |
| HEMATOLOGIA | RESULTADO | RANGO DE REFERENCIA |
| Recuento de Glóbulos Blancos | 3,770 | 5,000 a 10,000 por mm ³ |
| FORMULA DIFERENCIAL | - | - |
| Neutrófilos | 54% | 40 a 65 % |
| Linfocitos | 36% | 25 a 45 % |
| Eosinófilos | 6% | 0 a 5 % |
| Monocitos | 3% | 0 a 6 % |
| Basófilos | 1% | 0 a 1 % |
| Cayados | 0% | 0 a 3 % |