



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



# Evaluación de dos métodos de criopreservación de espermatozoides humanos

**ALUMNA:** Larribité Lucía

**DIRECTOR:** Martínez Alejandro Gustavo

**CODIRECTORA:** Milanesi Lorena

*Bahía Blanca*

*2025*



**Invida**

Medicina Reproductiva  
Hospital Italiano Regional del Sur





UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



# Evaluación de dos métodos de criopreservación de espermatozoides humanos

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lucía Larribité  
*Firma del Alumno*

Alejandro Gustavo Martínez  
*Firma del Director*

Lorena Milanesi  
*Firma del Codirector*



Invida

Medicina Reproductiva  
Hospital Italiano Regional del Sur





UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



# Evaluation of two methods of human sperm cryopreservation

BACHELOR'S THESIS IN BIOLOGICAL SCIENCES



**Invida**

Medicina Reproductiva  
Hospital Italiano Regional del Sur



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi director, el Dr. Alejandro Gustavo Martínez, por su compromiso, dedicación y constante acompañamiento. Gracias por tu tiempo, tu confianza y por brindarme un espacio de aprendizaje que contribuyó enormemente en mi formación. Agradecer también a todo el equipo del Centro de Medicina Reproductiva Fertilis, por recibirme con amabilidad y predisposición, y por su ayuda durante el desarrollo de las técnicas realizadas.

A Melina Calfuan, mi docente consejera, por haberme acompañado durante todos estos años. Gracias por tu paciencia, predisposición y por ayudarme siempre a resolver las dificultades que se presentaron en el camino.

A la Dra. Lorena Milanesi, mi codirectora, por su colaboración y por formar parte del equipo de dirección de esta tesis.

A Invida Medicina Reproductiva y todo su equipo de trabajo, por facilitarme las instalaciones, los recursos, por la calidez y el apoyo necesarios para llevar a cabo gran parte de este trabajo.

A mi familia, por ser el pilar más importante en todo este recorrido. A mi papá, por su apoyo incondicional durante todos estos años, por enseñarme a no bajar los brazos, a enfrentar las dificultades con fortalezas y a creer siempre en mí. A mi mamá, por ser mi ejemplo más grande, por el apoyo incondicional, por tu cariño, por estar siempre presente y por acompañarme en cada etapa; gracias por mostrarme el camino de la biología, especialmente el de la embriología y contagiarme tu pasión por esta profesión que ahora tenemos la suerte de compartir, ojalá algún día pueda ser la mitad de profesional que sos vos. A mi hermano, abuelos, tíos y primos, por su cariño constante, por acompañarme siempre y por celebrar cada uno de mis logros como si fueran propios.

A mis amigas de la vida, especialmente a Cele, Luji, Mili y Ana, por su apoyo constante, por escucharme, por acompañarme siempre y por alentarme en cada etapa.

Y a los amigos que me dio la universidad, con quienes compartí años de cursada, estudios, viajes, risas y aprendizajes. En especial al grupo de las chicas, que fueron una parte fundamental en todo este camino. Gracias por estar siempre, por el apoyo incondicional, por las horas compartidas, por las risas y los llantos, por sostenerme en los momentos difíciles y celebrar conmigo cada pequeño logro. Agradecerle en especial a Ro, que se convirtió en una hermana, por su cariño, compañía y por hacer este camino mucho más lindo.

Gracias, sin ustedes este recorrido no hubiese sido el mismo.

## RESUMEN

La infertilidad afecta a una de cada seis parejas y puede tener causas masculinas, femeninas o mixtas. En el varón, los principales factores incluyen disfunciones eyaculatorias, varicocele, criptorquidia, infecciones, tumores, tratamientos oncológicos y alteraciones genéticas, además de factores ambientales y de estilo de vida. Un parámetro clave en el estudio de la fertilidad masculina es la fragmentación del ADN espermático, la cual se asocia con menor tasa de fecundación, fallos de implantación y pérdida temprana del embarazo. Este trabajo tuvo como objetivo comparar dos métodos de criopreservación de espermatozoides —congelamiento lento y vitrificación— para evaluar su impacto en la integridad del ADN. Se analizaron 20 muestras de semen mediante el ensayo TUNEL. Los resultados mostraron que la vitrificación, basada en el uso de sacarosa como crioprotector no permeable, produjo menor fragmentación del ADN y mejor movilidad espermática en comparación con el congelamiento lento. Si bien la recuperación espermática fue algo menor en la vitrificación, la calidad celular resultó superior. Se concluye que la vitrificación representa una alternativa eficaz y menos dañina para la preservación del material genético masculino, con potencial aplicación en laboratorios de reproducción asistida para mejorar la calidad espermática post criopreservación.

**Palabras clave:** Vitrificación – Fragmentación del ADN – Reproducción asistida

## ABSTRACT

Infertility affects one in six couples and may result from male, female, or mixed factors. In men, the main causes include ejaculatory dysfunctions, varicocele, cryptorchidism, infections, tumors, oncological treatments, genetic alterations, and environmental or lifestyle factors. A key parameter in assessing male fertility is sperm DNA fragmentation, which is associated with lower fertilization rates, implantation failures, and early pregnancy loss. This study aimed to compare two sperm cryopreservation methods—slow freezing and vitrification—to evaluate their impact on DNA integrity. Twenty semen samples were analyzed using the TUNEL assay. Results showed that vitrification, based on the use of sucrose as a non-permeable cryoprotectant, produced lower DNA fragmentation levels and improved sperm motility compared to slow freezing. Although sperm recovery after vitrification was slightly lower, cell quality was significantly better. It is concluded that vitrification represents an effective and less damaging alternative for preserving male genetic material, with potential application in assisted reproduction laboratories to improve post-cryopreservation sperm quality.

**Keywords:** Vitrification – DNA fragmentation – Assisted reproduction

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Introducción .....	1
Definición de infertilidad .....	1
Causas de infertilidad.....	1
Técnicas de reproducción asistida.....	5
Fragmentación del ADN espermático .....	6
Criopreservación .....	10
Hipótesis.....	12
Objetivos .....	12
Materiales y métodos .....	13
Listado de equipos, material descartable, reactivos y medios empleados.....	13
Obtención de las muestras de semen.....	14
Evaluación de las muestras de semen .....	15
Criopreservación de espermatozoides.....	16
Congelamiento lento de espermatozoides .....	16
Vitrificación de espermatozoides.....	17
Evaluación de los niveles de fragmentación del ADN espermático.....	17
Diseño experimental.....	18
Diagrama del diseño experimental.....	19
Resultados .....	20
Discusión.....	23
Conclusiones .....	25
Bibliografía .....	26

## INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo determinada por la imposibilidad de lograr el embarazo luego de 12 meses o más de coitos regulares no protegidos. Las estadísticas muestran que aproximadamente una de seis parejas experimenta algún grado de infertilidad (Shah y Gher, 2023).

### CAUSAS DE INFERTILIDAD

En la población general las causas de infertilidad son un 50% de origen femeninas, un 40% masculinas y el 10% restante es esterilidad sin causa aparente (Souza y col., 2023).

Las causas más comunes de infertilidad son la disfunción ovulatoria, la infertilidad por factor masculino y la enfermedad tubárica. El estilo de vida y los factores ambientales, como el tabaquismo y la obesidad, pueden afectar negativamente la fertilidad. Los trastornos ovulatorios representan aproximadamente el 25% de los diagnósticos de infertilidad; el 70% de las mujeres con anovulación presentan síndrome de ovario poliquístico. La infertilidad también puede ser un marcador de una enfermedad crónica subyacente asociada con infertilidad. En las mujeres que presentan anovulación, la inducción de la ovulación con coito programado suele ser la elección terapéutica inicial más apropiada. En las parejas con infertilidad sin causa aparente, endometriosis o infertilidad masculina leve, se pueden realizar inicialmente de tres a cuatro ciclos de estimulación ovárica; mientras que la fecundación in vitro (FIV) debe considerarse si estos enfoques no resultan en embarazo. Dado que la fertilidad femenina disminuye con la edad, este factor debe guiar la toma de decisiones. La FIV inmediata puede considerarse como una estrategia de tratamiento de primera línea en mujeres mayores de 38 años. La FIV también está indicada en casos de infertilidad masculina grave o factor tubárico bilateral no tratado (Carson y Kallen, 2021).

### Causas de infertilidad masculina

Dentro de las causas más comunes que producen problemas de fertilidad en el hombre se puede mencionar la disfunción eyaculatoria con todas sus variantes. Estas incluyen la ausencia completa de eyaculación, la eyaculación retrógrada y la eyaculación precoz. Las dos primeras pueden tener un origen traumático, iatrogénico, farmacológico, metabólico y psicológico, mientras que la última puede deberse a causas sistémicas, inflamatorias o psicológicas. Hay evidencias que demuestran que ciertas afecciones del aparato reproductor masculino como varicocele, criptorquidia, y otras, también afectan la calidad seminal (Agarwal y col., 2021).

- Varicocele: Esta afección varicosa está presente en, aproximadamente, un 15% de los hombres y es una de las causas más comunes de infertilidad (Takács y col., 2025). El aumento local de temperatura producido por el varicocele provoca alteración en los parámetros seminales en los pacientes (Huyghe y col., 2023).



- Criptorquidia: Está causada por el no descenso de los testículos a la bolsa escrotal. Es la patología del tracto urogenital masculino más frecuente al momento del nacimiento y está asociada a determinadas complicaciones a largo plazo, como la infertilidad y la posibilidad de desencadenar tumores en los testículos no descendidos (Sharma y col., 2021).
- Orquitis: Es una infección e inflamación del tracto genital masculino y está considerada como una de las causas más frecuentes de la disminución de la fertilidad masculina. Hay evidencias de que la orquitis crónica genera daños irreversibles en la espermatogénesis. La atrofia testicular es una de las consecuencias de la orquitis, aunque también se puede perder por completo la fertilidad sin llegar a la atrofia (Chen y col., 2023).
- Tumores testiculares: Epidemiológicamente, los tumores en células germinales están asociados a criptorquidia, atrofia testicular, infertilidad masculina e hipospadias (desarrollo anormal del pene). Cuanto más agudo es el estado clínico de la enfermedad, más importante es la hipoespermioagénesis (Krege y col., 2023).
- Tratamientos oncológicos: Se ha encontrado que aquellos pacientes que son sometidos a quimioterapia, presentan una disfunción endocrina, mostrando niveles séricos de FSH incrementados inmediatamente después de la aplicación del tratamiento. Este tipo de tratamientos generan una disfunción del epitelio germinal. El tiempo y la severidad del deterioro de la espermatogénesis dependen de la dosis y duración de la quimioterapia y de la función testicular previa al tratamiento. A pesar de esta pronta depresión en la espermatogénesis, se encontró que 1 o 2 años después del tratamiento, un número razonable de pacientes recuperaron la funcionalidad testicular (López Dacal y col., 2023).
- La fragmentación del ADN espermático: Un creciente número de estudios reportan que el estudio de la fragmentación del ADN espermático es útil como herramienta de diagnóstico para la infertilidad masculina. Se ha encontrado una relación entre niveles altos de fragmentación y un pobre desarrollo embrionario, así como también falla en la implantación, aborto espontáneo y defectos congénitos en la descendencia (Martínez y col., 2021). La técnica más empleada para el estudio de este parámetro es el test de Tunel (Sharma y col., 2021).

La fragmentación del ADN espermático tiene múltiples causas tales como la presencia de un varicocele, factores hormonales, temperatura testicular o fiebre elevada, el uso de fármacos, la contaminación atmosférica, el tabaquismo o edad avanzada, entre otros. Los principales mecanismos moleculares implicados en las lesiones del material genético son: empaquetamiento anormal del ADN espermático durante el proceso de espermatogénesis, la

apoptosis abortiva y la presencia o acción sobre el ADN de las especies reactivas de oxígeno (Karavolos, 2021).

- Factores genéticos: Existen también factores genéticos responsables de la infertilidad masculina, que, se estima, corresponden a menos de un 5% de los casos (Venditti y Minucci, 2022). Estos se clasifican según si la alteración se debe a un único gen o a un defecto estructural o numérico de los cromosomas. En varios trabajos descriptivos realizados en hombres que asistieron a clínicas de fertilidad, se estudiaron las alteraciones cromosómicas asociadas a la infertilidad masculina. Estos estudios se subdividieron en tres grupos: Estudios de deleciones del cromosoma Y, de genes ligados al X y de autosomas.

Se encontraron alteraciones del brazo largo del cromosoma Y, reportando que un 4.6% de los pacientes presentaban una deleción total o parcial del gen AZFc. Esta deleción se correlaciona con un número muy bajo de espermatozoides o, inclusive, su ausencia. A partir de estos estudios pudo determinarse que este gen tiene una función relevante para la progresión de la espermatogénesis (Fan y Silber, 2002).

Las mutaciones en el cromosoma X también pueden resultar perjudiciales para la fertilidad masculina, ya que los hombres poseen únicamente una copia de este, con lo cual cualquier alteración en un gen relacionado con la espermatogénesis tendría un impacto inmediato en la producción espermática (Vockel y col., 2021).

Con respecto a los autosomas, se encontraron mutaciones en los genes STRA8 y ETV5. El efecto de las mutaciones en la reproducción resulta difícil de estudiar debido a la baja frecuencia de las mismas (Vockel y col., 2021).

Dentro de las patologías genéticas más frecuentes se pueden destacar:

- **Fibrosis Quística**: La expresión del gen de la fibrosis quística induce una síntesis defectuosa de una proteína en las células epiteliales del cuerpo denominada Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística (RTFQ). Cuando la proteína RTFQ es defectuosa, las células epiteliales no pueden regular la forma en que el cloruro pasa a través de las membranas celulares, lo cual altera el equilibrio fundamental entre el agua y las sales corporales. A nivel reproductivo, la presencia de la mutación de RTFQ induce un pobre desarrollo del conducto de Wolff y una consecuente azoospermia. La incidencia de esta enfermedad es de 1 en 2500 nacidos vivos (Campbell y col., 2023).
- **Síndrome de Klinefelter**: Es una forma de hipogonadismo masculino debido a esclerohialinosis testicular con atrofia y azoospermia, ginecomastia y una tasa elevada de gonadotrofinas. Este síndrome es producido por una anomalía de los cromosomas sexuales. En el 75% de los casos los individuos tienen un cariotipo 47,XXY; mientras que un 20% son mosaicos cromosómicos, siendo el más frecuente el 46,XY/47,XXY. También existen variantes como 48,XXYY, 48,XXXY, y 49,XXXXY en un 5% de casos. Tiene una incidencia de 1 de cada 1000 varones nacidos (Sa y col., 2023).

- **Síndrome de Kallmann:** Es uno de los trastornos genéticos más frecuentes en el campo de la infertilidad. La forma predominante es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X causado por una mutación en el gen KALIG-1 ubicado en Xp22.3, pero actualmente se han detectado diversas mutaciones genéticas autosómicas que también pueden causar este síndrome (Cariboni y Balasubremian, 2021). Los pacientes con síndrome de Kallmann presentan hipogonadismo hipogonadotrófico y anosmia, y pueden tener otras manifestaciones clínicas, entre ellas, asimetría facial, fisura palatina, ceguera para los colores, sordera, criptorquidia y alteraciones renales. La incidencia del síndrome es de 1 en 10000 nacimientos de varones (Thakker y col., 2020).
  
- **Otros factores:** Existen otros factores que podrían incidir en la alteración de los parámetros seminales normales y/o en la fertilidad de origen masculino:
  - **Período de abstinencia:** El período de abstinencia tiene un efecto pronunciado en los parámetros seminales, pudiendo afectar la morfología, la vitalidad, la movilidad, la concentración y el volumen (Ayad y col., 2022). Actualmente se recomiendan entre 3 y 5 días de abstinencia sexual.
  - **Edad del paciente:** Existe una controversia con respecto al correlato entre la fertilidad masculina y la edad. Algunos autores no encuentran diferencias entre los parámetros seminales de varones jóvenes y los de edad reproductiva avanzada, mientras que otros autores realizaron diversos estudios estadísticos donde encontraron una asociación entre la edad paterna avanzada y la disminución de la fertilidad (Hanevik y Hessen, 2022).
  - **Estrés oxidativo:** El nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el semen se utiliza como marcador del nivel de fertilidad, ya que existe una correlación positiva entre excesivos niveles de ROS y parámetros seminales anormales de concentración, movilidad y morfología (Kaltsas, 2023).
  - **Consumo de alcohol, tabaco y marihuana:** El alcohol puede ser clasificado como una toxina que afecta la reproducción, esto se ha observado tanto en el hombre como en animales de laboratorio. El consumo crónico de alcohol ha mostrado ser perjudicial sobre las hormonas reproductivas y sobre la calidad seminal. Estas alteraciones son acompañadas por la disminución del volumen, la concentración de espermatozoides, la movilidad y el número de espermatozoides normales en la muestra de los pacientes estudiados (Finelli y col., 2021).  
El tabaco y la marihuana están asociados a un aumento de las ROS en el semen. Esto produce alteraciones en la membrana plasmática de los espermatozoides y aumenta el grado de fragmentación del ADN (Basic y col., 2023).
  - **Estilo de vida:** Otra causa que produce alteración en la calidad seminal es el régimen de vida, éste puede cuantificarse según los eventos estresantes a los cuales el paciente se enfrenta. Se encontró que aquellos que sufrían estrés moderadamente alto presentaban

mayor probabilidad de tener alteradas la concentración, movilidad y morfología espermática según el criterio de la OMS. Los eventos estresantes, por lo tanto, pueden perjudicar los parámetros seminales y la fertilidad (Eisenberg y col., 2023).

## **TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA)**

Actualmente, las técnicas de reproducción asistida (TRA) incluyen no solamente la fecundación in vitro, sino también otras variantes diseñadas de acuerdo a las necesidades específicas de cada paciente. Estos procedimientos por lo general se hacen en combinación con terapias hormonales más convencionales para aumentar la fertilidad, con el propósito de incrementar los porcentajes de éxito.

Las técnicas de reproducción asistida pueden clasificarse en técnicas de baja complejidad, las cuales son menos invasivas, y las técnicas de alta complejidad que requieren de procedimientos quirúrgicos.

### **Técnicas de baja complejidad**

En este proceso se seleccionan los espermatozoides viables y móviles y luego se los deposita con un catéter directamente en el útero, acortando la distancia que tienen que recorrer los espermatozoides hasta el ovocito, eludiendo el cuello uterino, aumentando la probabilidad de que ambas gametas se encuentren y se logre la fecundación. (Vargas-Tominaga y col., 2020).

### **Técnicas de alta complejidad**

En la actualidad se estima que el número de bebés nacidos como resultado de las tecnologías de reproducción asistida de alta complejidad supera los 10 millones (Ahmadi y col., 2023)

El TRA más conocido actualmente es la fecundación in vitro (FIV). Para este procedimiento se extraen uno o más ovocitos de los ovarios de la mujer y se los coincuba con los espermatozoides previamente capacitados, esperando que se lleve a cabo la fecundación. Después de tres a cinco días de cultivo, algunos de los embriones obtenidos son colocados en la cavidad uterina mediante la utilización de un catéter, este procedimiento es denominado transferencia embrionaria (Choe y Shanks, 2023).

El desarrollo de la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) en el año 1992 trajo una herramienta eficaz para el tratamiento de la infertilidad masculina debido a su efectividad para tratar factores tales como bajo número de espermatozoides, poca motilidad, aberraciones morfológicas o cualquier otra condición que pueda dificultar que los espermatozoides fecunden naturalmente al ovocito. Así como también en aquellos casos donde el uso repetido de la fecundación in vitro convencional ha fallado (Jain y Singh, 2023). Esta técnica consiste en introducir mediante la utilización de un microscopio invertido con micromanipuladores un espermatozoide en el citoplasma del ovocito, atravesando las barreras de la zona pelúcida y la membrana plasmática mediante una microinyección empleando una aguja diseñada para esta práctica.

## **FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO**

La fragmentación del ADN produce un daño subletal en el espermatozoide permitiendo que este mantenga su funcionalidad, inclusive su capacidad de fecundar el ovocito, pero provocando un efecto no deseado en las etapas posteriores a la fecundación, como alteraciones tempranas en el patrón de desarrollo embrionario (Qiu y col., 2020).

Este efecto se hará evidente a lo largo del desarrollo del embrión preimplantacional, principalmente, al observar una mala calidad embrionaria, como también más adelante, al provocar fallas de implantación, una pérdida temprana del embarazo entre las semanas 7 y 10 de gestación y defectos congénitos en la descendencia (Marinero y Schlegel, 2025).

Debido a que el espermatozoide aporta el 50% de la carga genética del embrión, ha cobrado importancia el estudio de la fragmentación del ADN espermático como enfoque para abordar los problemas de fertilidad, que en muchos casos imposibilita tanto la concepción natural como la asistida. Pese a ello, no existe un consenso para fijar un valor de corte que determine el umbral de fragmentación del ADN espermático para considerarse un semen afectado por ella.

Algunos autores consideran que un valor del 20% sería el valor de corte (Agarwal y col., 2016) mientras que otros consideran dicho umbral en 30% (Colaco y Sakkas, 2018). Estos valores de corte dependen de la técnica aplicada para el estudio de la fragmentación del ADN espermático (Marinero y Schlegel, 2025).

### **Causas de la fragmentación del ADN espermático**

La fragmentación del ADN espermático, tal y como indica su nombre, se refiere a roturas o lesiones en el material genético del espermatozoide (Agarwal y col., 2020). El daño es originado durante la producción, la maduración o el transporte de los espermatozoides a través del tracto genital masculino (Agarwal y col., 2019).

Las causas que provocan la fragmentación pueden ser clasificadas en dos grupos: intrínsecas y extrínsecas. La principal causa intrínseca es la falla en el mecanismo de selección espermática durante la espermatogénesis. Debido a esta falla los espermatozoides y células primordiales que sufren lesiones de su cadena de ADN no son eficientemente eliminados mediante la apoptosis abortiva y forman parte del eyaculado. Otra causa intrínseca es la maduración epididimaria incorrecta, donde el empaquetamiento de la cromatina nuclear de los espermatozoides produce lesiones en el ADN espermático clave para la fertilización y la embriogénesis (Agarwal y col., 2019). La causa extrínseca más importante está representada por altos niveles de especies ROS en el aparato reproductor masculino (principalmente en el epidídimo). Se ha demostrado que este evento induce altos niveles de fragmentación del ADN espermático (Agarwal y col., 2020a, 2020b).

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad la fragmentación del ADN espermático es la principal causa molecular de la infertilidad masculina y tiene un efecto negativo en los resultados reproductivos de las parejas (Agarwal y col., 2019). Hasta la fecha, diversos estudios realizados han

encontrado una estrecha asociación entre este parámetro seminal y la disminución de las tasas de fecundación, el fracaso de la implantación y el desarrollo anormal del embrión (Gode y col., 2020). Los mismos concluyeron que al aumentar el grado de fragmentación del ADN espermático, provocan la disminución de los resultados de los tratamientos de FIV e ICSI (Agarwal y col., 2019; Martínez y col., 2021; Miller y col., 2020). Sin embargo, aún las causas y efectos de los daños provocados en el ADN de los espermatozoides continúa en investigación.

Por otra parte, también se ha descubierto que presentan niveles elevados de fragmentación del ADN espermático hombres infértiles con parámetros de semen normozoospermico, lo cual explicaría la pérdida de embarazo recurrente inexplicable en parejas masculinas normozoospermicas. Por lo tanto, queda en evidencia que, la fragmentación del ADN espermático juega un rol importante en la infertilidad masculina, de modo que, a mayor número de lesiones, menor será la integridad del material genético (comprometiendo el potencial fecundante del espermatozoide), y por ende, las probabilidades de que se produzca un embarazo a término (Agarwal y col., 2019).

Estos hallazgos demuestran el déficit del análisis seminal en la evaluación del gameto masculino y por ello, actualmente está cobrando mayor relevancia la inclusión del estudio de la fragmentación del ADN espermático como técnica de rutina en el espermograma.

### **Estudio de la fragmentación del ADN espermático**

Las técnicas que marcan específicamente las lesiones en la cadena de ADN mediante la incorporación de moléculas marcadas con fluorocromos son: Ensayo cometa (Singh y col., 1988) y TUNEL o *Terminal deoxyribonucleotidyltransferase-mediated Uridine 5-triphosphate-biotin Nick-End Labeling Assay* (Lopes y col., 1998).

La técnica de Tunel ha mostrado una alta correlación entre los resultados del estudio y las tasas de embarazo logradas por fecundación in vitro, lo cual le confiere un alto valor predictivo (Martínez y col., 2021). Este ensayo ha mostrado ser altamente confiable para identificar las lesiones de ADN de cadena simple y doble en los espermatozoides de muestras de semen, particularmente, cuantificando la cantidad de roturas mediante fluorescencia de nucleótidos marcados que se unen a estas. Debido a su procedimiento rápido, sencillo y que su protocolo está estandarizado, esta técnica es de las más utilizadas a nivel mundial en los laboratorios de andrología para la medición de la fragmentación del ADN espermático (Agarwal y col., 2019). Hay trabajos que han mostrado resultados significativamente mayores en la disminución en la tasa de embarazo e incremento en la tasa de abortos espontáneos cuando se detectan por Tunel altos niveles de fragmentación en el material genético de los espermatozoides, en comparación a los resultados no significativos obtenidos mediante otras técnicas (Martínez y col., 2021).

### **Tratamiento de la fragmentación del ADN espermático**

En algunos casos, el ovocito puede reparar naturalmente el daño del ADN del espermatozoide que lo fecunda. Esto depende del tipo de lesión del ADN, el porcentaje de ADN afectado y de la calidad del ovocito; un factor generalmente ligado a la edad de la paciente (Colaco y Sakas, 2018). Pese a ello, la

opción más apropiada en un tratamiento de fecundación asistida es contar con espermatozoides cuyo ADN presente un alto nivel de integridad. En la actualidad no se cuenta con una técnica que repare dicho ADN y solo existen estrategias para reducir el nivel de fragmentación del ADN espermático de una muestra que, si se aplican en los tratamientos de reproducción asistida, pueden mejorar los resultados (Marinero y Schlegel, 2025).

Estas estrategias pueden dividirse en dos grupos: aquellas que buscan mejorar el resultado de espermatogénesis y las que actúan sobre la muestra seminal con el objetivo de eliminar los espermatozoides con el ADN fragmentado. En el primer grupo podemos mencionar a las terapias con antioxidantes orales (vitaminas C y E, Zinc y Selenio), cambios en el estilo de vida del varón tales como dejar de fumar, evitar el consumo de alimentos con alto contenido graso, el alcohol y las drogas, aumentar el nivel de actividad física, tratar las infecciones e inflamaciones del tracto genital masculino, sin dejar de mencionar las cirugías de varicocele (Takács y col., 2025). En el segundo grupo se encuentran la estrategia de acortar la abstinencia eyaculatoria, la biopsia testicular y la aplicación de técnicas de selección espermática en el laboratorio (Esteves y col., 2020).

Existe una variedad de técnicas de laboratorio que pueden ser aplicadas para eliminar a los espermatozoides con ADN fragmentado que han mostrado diferente grado de éxito, las cuales han sido descritas por diversos autores. Entre ellas las más empleadas son: *swim-up*, gradientes de densidad y separación magnética por columnas de Anexina-V (Boomsma y col., 2019; Vaughan y Sakkas, 2019). Recientemente ha sido desarrollado un sistema de selección mediante una membrana microfluídica, la cual simula en un medio artificial el proceso del pasaje del espermatozoide por el tracto reproductor femenino (Parrella y col., 2019). A continuación, se describen los cuatro métodos.

- Swim-up: Para esta técnica, la concentración y principalmente la motilidad espermática es un requisito esencial, ya que se basa en la capacidad de movimiento de los espermatozoides para migrar desde el líquido seminal hacia el medio cultivo. Se realiza colocando medio de cultivo en un tubo y por debajo de la solución la muestra de semen. Durante el tiempo de incubación, los espermatozoides móviles nadan a través del medio y así se separan del resto de los componentes del plasma seminal.
- Gradiente de densidad: Estos gradientes separan los espermatozoides en función de su punto isopícnico, es decir, dividen las partículas en función de su densidad de flotación. Los diferentes componentes se separan hasta alcanzar una posición en la que su densidad es igual a la de su entorno (flotabilidad neutra), donde ya no se desplaza más. Los espermatozoides maduros son células compactadas y alcanzan el gradiente de mayor densidad ubicado en el fondo del tubo. Contrariamente, el plasma seminal permanece flotando sobre el gradiente de menor densidad y las otras células junto a los espermatozoides inmaduros y muertos se sitúan en la interfase entre los dos gradientes.

Tanto el *swim-up* como el gradiente de densidad son las técnicas de capacitación espermática más difundidas en los laboratorios de andrología y han sido desarrolladas en la década del 90, sin sufrir prácticamente cambios.

- Separación magnética por columnas de Anexina-V: Esta es una técnica de selección que aplicada a muestras de semen permite eliminar del eyaculado aquellos espermatozoides con su ADN fragmentado. Esto se consigue tras la incubación de la muestra de semen con Anexina-V conjugada con esferas de hierro biodegradables y posteriormente haciéndola pasar por una columna sometida a un campo magnético.

La Anexina V es una proteína con elevada afinidad por la fosfatidilserina. Los espermatozoides con su ADN fragmentado exponen esta molécula en el exterior de su membrana plasmática, por lo cual la Anexina V se une a ella y por consiguiente los espermatozoides quedan unidos a las esferas metálicas que la acompañan. Por esa razón al pasar por el campo magnético estos espermatozoides quedarán retenidos. Los espermatozoides libres de Anexina-V serán recuperados por elución a la salida de la columna para ser utilizados en los tratamientos de reproducción asistida. Esta técnica ha sido cuestionada por el hecho de someter a los espermatozoides a un campo magnético varias veces superior al terrestre, sin conocer realmente el efecto que esto podría provocarles.

- Sistemas microfluídicos: A partir del avance tecnológico, hoy se dispone para los casos donde la fragmentación del ADN espermático está aumentada, herramientas diseñadas por equipos interdisciplinarios de ingenieros, médicos, biólogos, químicos, fisiólogos, etc. Estas herramientas son los dispositivos microfluídicos, también conocidos como lab-on-a-chip. La microfluídica como ciencia, se ocupa de la manipulación precisa de pequeñas cantidades de fluidos, lo cual normalmente se realiza en microcanales o microporos con dimensiones de unos pocos cientos de micrómetros que funcionan como barreras de selección (Gisbert Iranzo y col., 2025). La ventaja de estas barreras es que sus dimensiones se encuentran en el mismo orden que las de muchas partículas biológicas (1–100  $\mu\text{m}$ ). Por lo tanto, cada vez crece más su uso dentro del campo médico e incluso se han hecho adaptaciones en el área de los tratamientos de reproducción asistida para la selección de espermatozoides.

Para los espermatozoides es ideal el empleo de este chip, debido a que simula la geometría de regiones microconfinadas dentro del tracto reproductivo femenino, lo que permite enfoques de selección basados en biomimetismo que son más representativos del entorno de selección in vivo. Además, algunos estudios observaron que esta metodología no provoca daño al ADN de los espermatozoides y no aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno, de modo que, las tasas de éxito de los tratamientos de reproducción asistida en la infertilidad por factor masculino mejorarían (Vaughan y Sakkas, 2019).



Cuando se comparan las técnicas convencionales de selección espermática con la tecnología emergente, esta última puede mejorar la recuperación de espermatozoides móviles de muestras de semen heterogéneas, seleccionando subpoblaciones que posean mayor capacidad fecundante, ya que imita más de cerca los procesos de selección natural y evita algunos de los elementos más perjudiciales de dichas técnicas convencionales (Gisbert Iranzo y col., 2025). Si bien algunos estudios han arrojado resultados prometedores con esta nueva tecnología, sigue siendo un campo en desarrollo que requiere de más investigación para aportar al conocimiento actual y comprobar su eficacia tanto en el tratamiento de la infertilidad masculina como en los tratamientos de reproducción asistida.

## **CRIOPRESERVACIÓN**

La preservación de fertilidad en el hombre mediante la criopreservación de espermatozoides es de gran interés debido a que se puede utilizar para preservar el material genético masculino antes de iniciar un tratamiento de quimioterapia o radioterapia, así como también, en hombres con enfermedades autoinmunes o previo a procedimientos quirúrgicos que pueden conducir a insuficiencia testicular o disfunción eyaculatoria (Eisenberg y col., 2023).

Cuando las células o los sistemas celulares son expuestos a la formación de hielo por exposición a temperaturas menores a 0°C están sujetos a profundos cambios en el estado físico y propiedades químicas de su entorno circundante. El agua líquida cumple un rol esencial en la estructura y función de los sistemas vivos, pero durante el congelamiento su presencia dentro de la célula puede provocar un daño irreparable si se congela. Para ello, durante el congelamiento se debe reducir en forma progresiva la cantidad de líquido intracelular, con el objetivo de evitar la formación de hielo y el consecuente daño celular (Tamburrino y col., 2023).

El método de crioconservación, desarrollado en la década de 1950, todavía se utiliza hoy en día y se basa en el uso de una velocidad de enfriamiento relativamente lenta (1-170°C/min) en una región de temperaturas críticas (de -10°C a -60°C). Las células pueden soportar el almacenamiento a temperaturas muy bajas. Sin embargo, los procesos que las células atraviesan tanto en el congelamiento como en el descongelamiento asociados al rango crítico de temperatura intermedia (-10°C a -60°C) pueden ser letales para las mismas. El objetivo del uso de velocidades de enfriamiento lentas es mantener un equilibrio muy delicado entre la formación de cristales de hielo y la creciente concentración de sustancias disueltas. El peligro es el daño celular debido a la cristalización del agua intracelular y daño osmótico o por enfriamiento, rotura de la membrana citoplasmática o incluso efectos sobre el citoesqueleto y el genoma (Tamburrino y col., 2023).

A pesar de estos riesgos, el uso del congelamiento lento convencional permite la conservación de grandes volúmenes de muestras de semen, con resultados satisfactorios sobre la vitalidad y motilidad después del descongelamiento, así como una perfecta integridad de la membrana acrosomal y citoplasmática, actividad funcional de las mitocondrias, estabilidad del ADN y la prevención de la

translocación de fosfolípidos dentro de las membranas de los espermatozoides (Tamburrino y col., 2023).

Con el paso del tiempo se desarrolló un nuevo método de criopreservación denominado vitrificación, que es la solidificación de una solución a baja temperatura, no por la cristalización de hielo si no por aumento extremo de la viscosidad durante el congelamiento. Este método es beneficioso en comparación al congelamiento lento ya que es mucho más rápido, sencillo y barato. Se basa en el congelamiento de las células por inmersión directa en nitrógeno líquido (LN<sub>2</sub>), evitando la formación de grandes cristales de hielo intracelulares. La vitrificación del agua se logra mediante el incremento de las velocidades de conducción de temperatura y de las concentraciones de crioprotectores permeables.

En la actualidad, el método de vitrificación se utiliza con éxito para la preservación de gametos femeninos y embriones. Sin embargo, la aplicación de este protocolo para la crioconservación de espermatozoides ha encontrado algunas limitaciones debido a los efectos osmóticos y citotóxicos que causa el uso de estos crioprotectores. Recientemente ha comenzado a investigarse el uso de soluciones de sacarosa para la vitrificación de estas células debido a sus propiedades únicas como crioprotector no permeable. Durante la deshidratación celular la sacarosa compensa la disminución de presión osmótica actuando como tampón osmótico; también estabiliza la membrana plasmática de los espermatozoides; además reduce la toxicidad del crioprotector debido a su baja concentración; influye en la viscosidad de la solución de vitrificación y, al construir una matriz viscosa, evita la cristalización durante el congelamiento y descongelamiento (Ozimic y col., 2023).

Por estas razones en el presente trabajo se propone la puesta a punto de un método de vitrificación basado en la utilización de sacarosa como crioprotector no permeable, el cual ayudará a eliminar rápidamente el agua intracelular y disminuyendo el tiempo de exposición de las células a la solución de criopreservación, resultando en la disminución del daño de la membrana plasmática y del ADN de los espermatozoides.

## **HIPÓTESIS**

La población de espermatozoides vitrificados presenta una mejor tasa de sobrevivencia y un menor nivel de fragmentación del ADN espermático que aquellas criopreservadas por congelamiento lento.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Aportar datos concretos al área de reproducción para alcanzar un diagnóstico preciso que facilite la toma de decisiones sobre los procedimientos clínicos a seguir en la preservación de espermatozoides.

### **Específicos**

- Poner a punto el protocolo de vitrificación de espermatozoides.
- Determinar la diferencia de los niveles de fragmentación del ADN espermático en muestras de semen luego de ser procesadas.
- Establecer niveles de fragmentación del ADN espermático en muestras de semen criopreservadas mediante congelamiento lento y vitrificación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Listado de equipos, material descartable, reactivos y medios empleados

Equipos de laboratorio	Fabricante	Origen
Calienta tubos	Microvisión	Argentina
Cámara de Makler	Sefi Medical	Israel
Centrífuga	Rolco	China
Flujo laminar	Thermo Forma Scientific	Reino Unido
Microscopio de fluorescencia Ei2	Niko	Japón
Pipetas automáticas	Finnpipette	Reino Unido
Platina térmica	Microvisión	Argentina
Termo de nitrógeno líquido	MVE	EEUU

Reactivos y medios	Fabricante	Origen	# Catalogo
Aceite de Inmersión	Sigma	EEUU	I-0765
Albúmina Bovina Fracción V	Sigma	EEUU	a3059
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	Gibco	EEUU	30063721
Formaldehído 37%	Sigma	EEUU	F8775
<i>In situ Death Cell Detection kit</i>	Roche	EEUU	11684795910
Metanol	Sigma	EEUU	494437
G-MOPS plus	Vitrolife	Suecia	513232
PBS	Irvine	EEUU	9235
Polilicina 0.1%	Sigma	EEUU	P8920
<i>Sperm Freeze Solution</i>	Vitrolife	Suecia	10137
<i>UltraPure Distilled Water</i>	Invitrogen	EEUU	10977-015
<i>Vecta-shield</i>	Vector Lab	EEUU	H-1000

Material descartable	Fabricante	Origen	# Catalogo
Crioviales 1.8 ml	Nunc	Dinamarca	368632
Cubreobjetos 24x50 mm	Sail Brand	China	7201
Filtro de jeringa de 0.20 µm	Corning	Alemania	431219
Microtubos 0.2 ml	Corning	Inglaterra	6531
Microtubos 1.5 ml	Corning	Inglaterra	6530
Pipeta serológica de 2 ml	Nunc	Dinamarca	159617
Placas de Petri de 90 mm	Nunc	Dinamarca	150360
<i>Teflon Printed Slide</i> para TUNEL	EMS	EEUU	63429-04
Tips 0-10 µl	Corning	México	4894
Tips 0-200 µl	Corning	México	4864
Tubo de centrifuga de 15 ml	Thermo Scientific	Corea	339651
Varilla de aluminio para crioviales	Nunc	USA	135678

### Obtención de las muestras de semen

Se realizó un estudio prospectivo con el fin de analizar los resultados obtenidos por 20 pacientes masculinos que realizaron un espermograma en Invida Medicina Reproductiva y Medicina Reproductiva Fertilis, ambos centros de fertilidad de Buenos Aires, Argentina, entre febrero y agosto de 2025. Los pacientes firmaron el respectivo consentimiento aceptando que su muestra sea empleada en el estudio. El Comité de Ética de Hospital Italiano Regional del Sur, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina aprobó el protocolo del estudio.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

Edad de los pacientes: 25 a 40 años

Parámetros seminales de la OMS (OMS, 2021):

- Volumen:  $\geq 1,5$  ml
- Concentración:  $\geq 15 \times 10^6$  espermatozoides/ml
- Motilidad progresiva:  $\geq 32\%$
- Viabilidad:  $\geq 58\%$
- Morfología:  $\geq 4\%$

Se excluyeron aquellos pacientes con azoospermia, criptoospermia, eyaculación retrógrada, leucocitospermia o varicocele, aquellos que habían estado expuestos a quimioterapia, radioterapia o pesticidas y otros tóxicos, y aquellos con antecedentes de infección o fiebre en los tres meses anteriores al tratamiento.

### Evaluación de las muestras de semen

Las muestras de semen se recolectaron por masturbación en un frasco estéril después de 2 a 5 días de abstinencia sexual. El volumen de semen se midió después de 30-60 minutos y la concentración y motilidad del semen se evaluaron utilizando una cámara de conteo Makler.

La cámara de Makler tiene una cuadrícula que mide 1 x 1 mm, y tiene una profundidad de sólo 0.01 mm. (Figura 1). Está subdividida en 100 cuadrantes de 0.1 x 0.1 mm cada uno, por lo que el volumen en total en la cámara es 0.01  $\mu$ l (Figura 2). Para el recuento de células espermáticas se transfirieron a la cámara 5  $\mu$ l de muestra de semen, la cual se observó al microscopio 100x. El número total de espermatozoides contado en una columna de la cámara es la concentración final de la muestra expresada como  $10^6$  espermatozoides/ ml.



Figura 1 - Cámara Makler para conteo espermático.

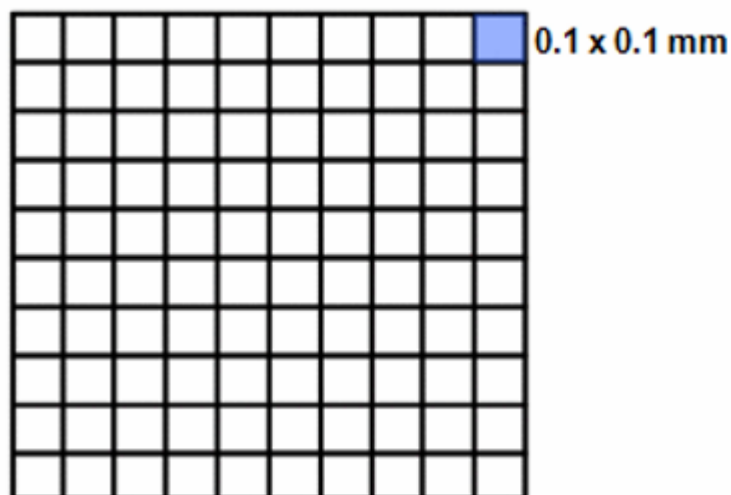


Figura 2 - Cuadrícula cámara de recuento Makler.

La movilidad se evaluó de acuerdo al Manual de OMS 2021 según dos factores: el tipo y agresividad del movimiento o movilidad cualitativa (velocidad o progresión hacia adelante) y la movilidad cuantitativa expresada en porcentaje de espermatozoides activos e inactivos (% de movilidad) (WHO, 2021).

Movilidad Progresiva: Para calcular la movilidad progresiva se detallaron los porcentajes de cuatro tipos de movilidades graduadas desde A hasta D. Empleando la cámara, se contaron 100 espermatozoides para calcular qué porcentaje hay en cada categoría:

- Grado A: Movilidad progresiva rápida
- Grado B: Movilidad progresiva lenta
- Grado C: Movilidad no progresiva
- Grado D: Inmovilidad

Las muestras de semen se procesaron mediante un *swim-up* en un tubo de centrífuga de 15 ml que contenía 2 ml de G-MOPS plus (OMS, 2021). Luego de 1 hora de incubación se tomó la fracción superior del G-MOPS plus, la cual contenía los espermatozoides que habían nadado hacia ella. Las muestras se centrifugaron a 300 g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se volvieron a suspender en 0,4 ml de medio G-MOPS plus. Finalmente se evaluó la movilidad de la muestra recuperada.

### **Criopreservación de espermatozoides**

Las muestras de espermatozoides fueron criopreservadas empleando dos técnicas: congelamiento lento y vitrificación.

#### **Congelamiento lento de espermatozoides**

Para el congelamiento lento la muestra fue colocada en un criovial de 1.8 ml previamente rotulado con el número de identificación de la muestra. Luego se le agregó en proporción 1:1 *Sperm Freeze Solution* goteando lentamente. Luego se mezcló hasta lograr una solución homogénea. El criovial se dejó reposar en vapores de nitrógeno (-170°C a -180°C) durante 1 minuto y finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido. Una vez finalizado el procedimiento, se colocaron en una varilla de aluminio identificada la cual se sumergió en el tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento.

Para el descongelamiento de las muestras criopreservadas por congelamiento lento se retiraron las varillas de los tanques de nitrógeno y fueron separados los crioviales según sus respectivas identificaciones, se los colocó en un baño de agua a 37°C hasta alcanzar el estado líquido. Luego, se diluyó el contenido del criovial en un tubo de centrífuga de 15 ml en proporción 1:1 con G-MOPS plus a 37°C, mezclando la solución por agitación lenta. Se centrifugó por 10 min a 300g, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 0.4 ml de G-MOPS plus. Luego de evaluada la concentración y la movilidad espermática se procedió a fijar la muestra con Formaldehído al 37% para luego realizar la técnica de TUNEL.

### **Vitrificación de espermatozoides**

Para la vitrificación la muestra fue colocada en un tubo de centrifuga de 15 ml previamente rotulado con el número de identificación de la muestra. Luego se le agregó en proporción 1:1 una solución 0.5 M de sacarosa en G-MOPS plus goteando lentamente. Luego se mezcló hasta lograr una solución homogénea. La muestra se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se preparó un contenedor con nitrógeno líquido al cual se le insertó una rejilla profunda para contener las muestras a vitrificar. Para llevar a cabo la vitrificación, se utilizaron 35 µl de muestra posicionando la pipeta en ángulo de 45° a 10 cm de la superficie del nitrógeno y se dejó caer de a una gota esperando que esta se solidifique y se deposite en el fondo de la rejilla en forma de perlas. Una vez finalizado este procedimiento, estas perlas se colocaron en crioviales en una varilla de aluminio identificada la cual se sumergió en el tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento.

Para la desvitrificación, las perlas se sumergieron en 5 ml de G-MOPS plus precalentado a 37°C agitando suavemente durante 10 segundos. Posteriormente la muestra fue centrifugada durante 5 minutos a 350g y para finalizar se realizó la resuspensión del pellet en 0.4 ml de G-MOPS plus. Luego de evaluada la concentración y la movilidad espermática se procedió a fijar la muestra con Formaldehído al 37% para luego realizar la técnica de TUNEL.

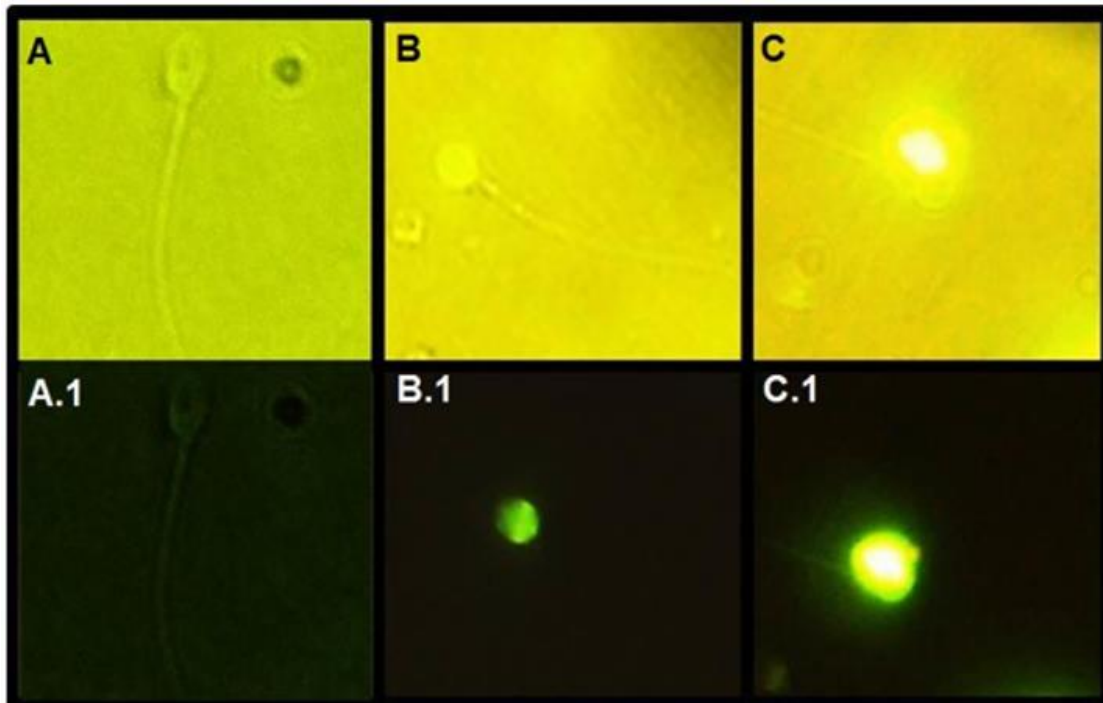
### **Evaluación de los niveles de fragmentación del ADN espermático**

Los niveles de fragmentación del ADN espermático se determinaron empleando el ensayo *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling* - TUNEL (Lopes y col., 1998). Con este fin, los portaobjetos impresos de teflón para TUNEL se sumergieron durante al menos 2 horas en poli-L-lisina al 0,1%, y luego se enjuagaron con agua ultrapura y se secaron a temperatura ambiente.

Luego, las muestras seleccionadas para este estudio se fijaron con formaldehído al 37% y se almacenaron a 4-8 °C hasta su uso. Para evaluar la fragmentación del ADN, se colocaron alícuotas de 30 µl de las muestras en portaobjetos excavados por duplicado, y luego los portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda durante 24 horas a 4-8 °C. Después de ese tiempo, las muestras se lavaron tres veces durante 5 min con 10 µl de solución PBS 1X. Luego se agregó metanol durante 90 segundos y las diapositivas se lavaron nuevamente tres veces con PBS 1X. A continuación, se añadieron 10 µl de solución bloqueante compuesta por PBS + Albúmina Sérica Bovina al 0,5% y se dejó actuar durante 45 min dentro de la cámara húmeda a 4-8°C. Posteriormente, se realizaron otros tres lavados con PBS 1X. Se agregó una mezcla de 30 µl de label fluorescente y 5 µl de enzima empelando el *kit* de detección de células muertas *in situ* Roche a cada pocillo de los portaobjetos excavados, se protegió de la luz y luego se colocaron los portaobjetos en una cámara húmeda durante 1 horas en una placa térmica a 37°C. A continuación, se realizaron tres lavados de 5 min con 10 µl de PBS 1X y luego se dejaron secar completamente a temperatura ambiente, evitando siempre la exposición a la luz. Finalmente, se agregaron 5 µl de agente de montaje *Vecta-Shield* a cada pocillo y se colocó un cubreobjetos. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia convencional a un aumento



de 1000x con aceite de inmersión empleando el filtro apropiado para la fluorescencia verde. Los espermatozoides con fluorescencia superior al 50% en el citoplasma se consideraron positivos, mientras que el resto se consideraron negativos (Figura 3). Un pocillo adicional del portaobjetos excavado se incubó con ADNasa 1 U/ml durante 30 minutos a 37°C como control positivo, y en otro pocillo se omitió la solución TUNEL como control negativo. El número de espermatozoides con ADN fragmentado se registró como el promedio de dos recuentos de 100 espermatozoides cada uno (total 200) y se calculó el porcentaje de células con TUNEL positivo.



**Figura 3 - Espermatozoides con diferentes patrones de marcación de TUNEL (1000x).**

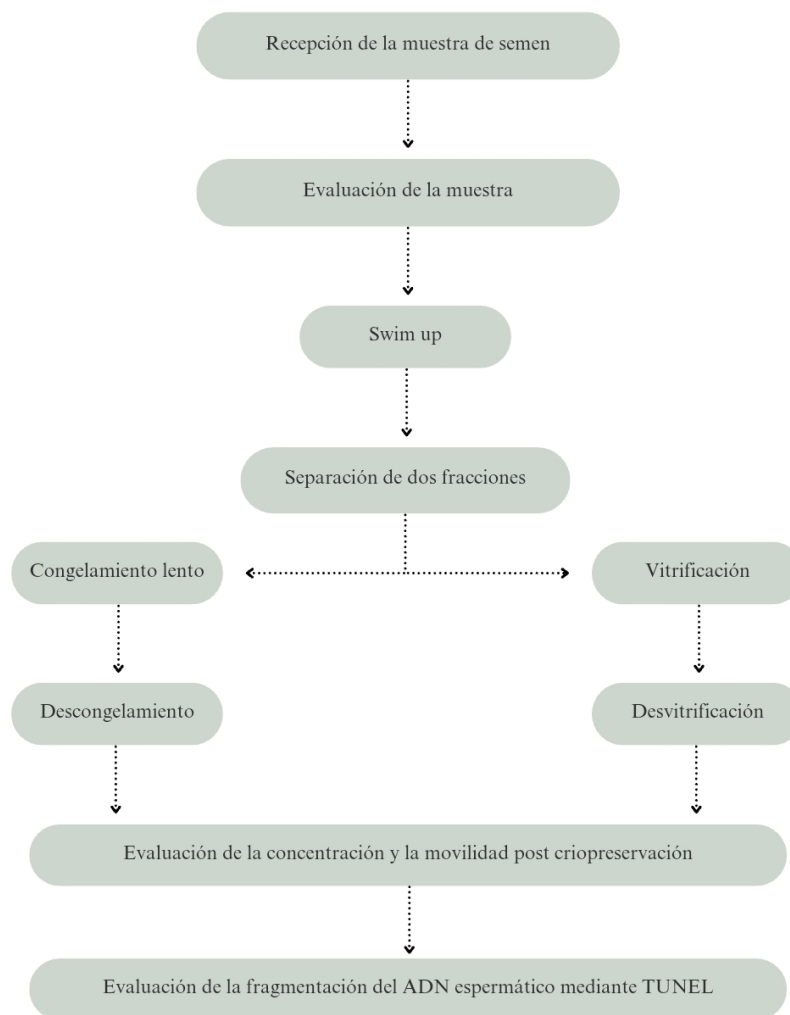
A: Espermatozoide negativo para TUNEL: Imagen superior: campo claro, imagen inferior: fluorescencia. B: Espermatozoide negativo para TUNEL con <50% de fluorescencia. Imagen superior: campo claro, imagen inferior: fluorescencia. C: Espermatozoide positivo para TUNEL con >50% de fluorescencia. Imagen superior: campo claro, imagen inferior: fluorescencia (de Riva y col., 2018).

### **Diseño experimental**

Se compararon dos métodos de criopreservación: el congelamiento lento y la vitrificación.

Una vez procesada mediante un *swim-up* la muestra de cada paciente fue dividida en dos fracciones una de las cuales fue destinada al congelamiento lento y la otra a la vitrificación.

## Diagrama del diseño experimental



## RESULTADOS

Se emplearon 20 muestras de pacientes que realizaron un espermograma en Invida Medicina Reproductiva y Medicina Reproductiva Fertilis. El rango de edad de los pacientes fue 27 a 40 años (promedio de edad  $34\pm 4.9$  años).

Los parámetros seminales de las muestras frescas empleadas para la comparación de las técnicas de criopreservación de espermatozoides se detallan en la Tabla 1.

Luego del descongelamiento y la desvitrificación se registraron nuevamente la concentración de espermatozoides recuperados, así como también su movilidad y el valor de TUNEL (Tabla 2 y Gráfico 1). La recuperación espermática post desvitrificación fue significativamente menor que post descongelamiento, mientras que, con respecto a la movilidad, se observaron diferencias significativas en favor de las muestras desvitrificadas para los valores de movilidad A, B e inmóviles. El TUNEL presentó valores significativamente mayores para la muestra post descongelamiento lento comparándolos con los de la muestra post desvitrificación. En la Figura 4 se observan las diferencias entre la marcación fluorescente obtenida en espermatozoides desvitrificados y descongelados.

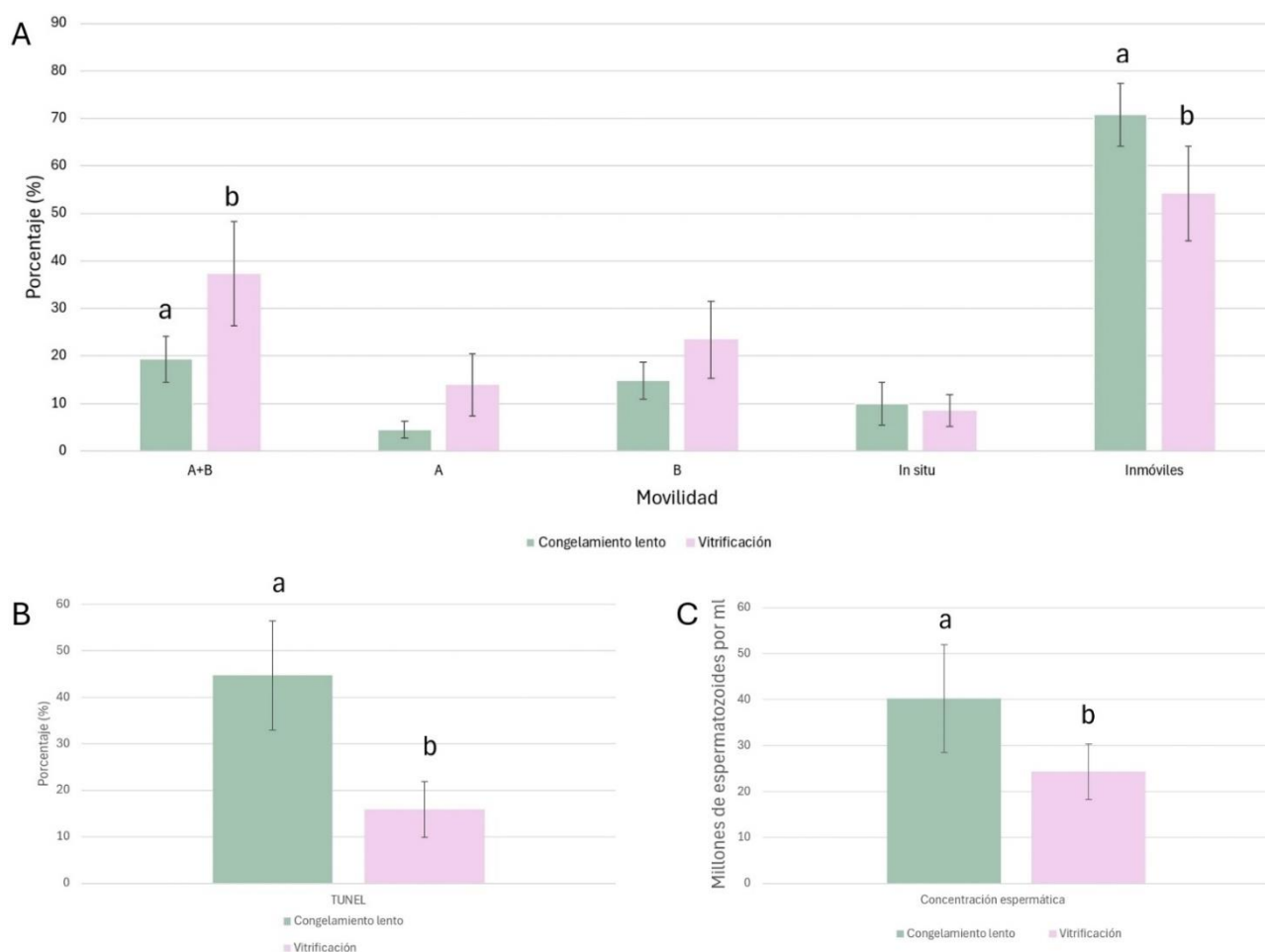
**Tabla 1: Parámetros espermáticos analizados previos a la criopreservación**

N	20
Volumen	$2.5\pm 0.5$
Concentración espermática ( $10^6/\text{ml}$ )	$65.3\pm 34.9$
Movilidad A+B (%)	$52.4\pm 13.5$
Movilidad A (%)	$9.2\pm 6.3$
Movilidad B (%)	$43.2\pm 11.4$
Movilidad in situ (%)	$11.3\pm 7.5$
Inmóviles (%)	$36.3\pm 13.7$
Concentración espermática post <i>swim-up</i> ( $10^6/\text{ml}$ )	$82.0\pm 63.5$
Movilidad A post <i>swim-up</i> (%)	$88.5\pm 7.8$

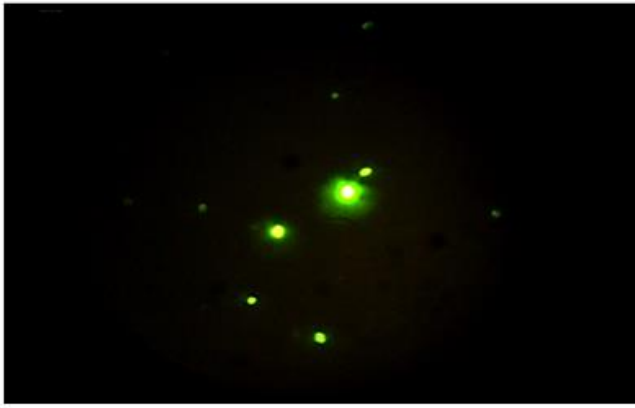
**Tabla 2: Parámetros espermáticos analizados luego de la criopreservación**

Tratamiento	Congelamiento lento	Vitrificación
Concentración espermática (10 <sup>6</sup> /ml)	40.2 ± 26.4 a	24.3±13.6 b
Movilidad A+B (%)	19,3±4,9 a	37.3±11.0 b
Movilidad A (%)	4.5±1.8	13.9±6.6
Movilidad B (%)	14.8±3.9	23.4 ±8.1
Movilidad in situ (%)	9.9±4.5	8.5 ±3.3
Inmóviles (%)	70.8±6.6 a	54.2 ±10.0 b
TUNEL cada 200 espermatozoides (%)	44.7±11.7 a	15.9 ±6.0 b

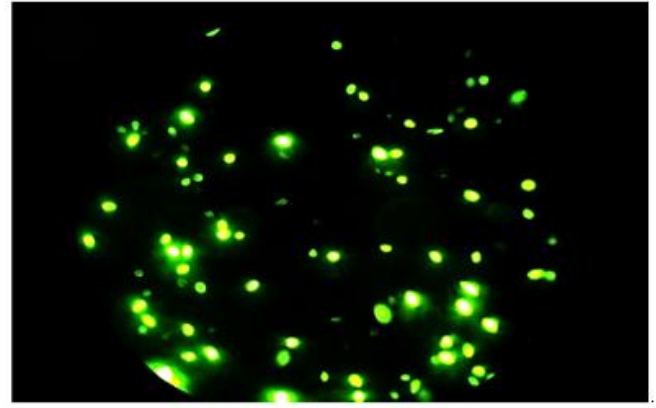
(a,b) Difieren significativamente (p<0.05)



**Gráfico 1: Gráfico comparativo de los parámetros espermáticos analizados luego de la criopreservación.** El gráfico muestra la comparación entre el congelamiento lento y la vitrificación para los distintos parámetros espermáticos evaluados. Se observa que la vitrificación presenta mayores valores de motilidad A+B, mientras que el congelamiento lento muestra un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides inmóviles. El número de espermatozoides TUNEL positivo fue mayor en las muestras sometidas a congelamiento lento. La concentración espermática es mayor en el congelamiento lento.



**Vitrificación**



**Congelamiento lento**

**Figura 4: Resultados del ensayo de TUNEL, microscopía de fluorescencia convencional.**

La imagen evidencia la diferencia en la marcación fluorescente entre las técnicas de criopreservación. Las muestras sometidas a congelamiento lento presentan una mayor cantidad de espermatozoides con marcación positiva (fluorescencia verde intensa), mientras que la vitrificación muestra menos células marcadas. Magnificación del original: 1000x.

## DISCUSIÓN

La criopreservación de gametos es una práctica habitual en los laboratorios de fecundación asistida. Hoy en día es común que varones que buscan preservar su fertilidad, diferir la búsqueda de un embarazo o tener una reserva de espermatozoides en caso de ausencia de éstos durante el tratamiento de fecundación asistida, recurran a la criopreservación espermática.

Desde la década de 1950 se recurre a la criopreservación de espermatozoides de diferentes especies animales mediante la técnica de congelamiento lento (Polge y Rowson, 1950). Esta técnica implica someter a los espermatozoides al intercambio parcial del agua intracelular por crioprotectores para luego realizar un descenso controlado de la temperatura hasta alcanzar la inmersión definitiva en LN2 (-196°C). Esto tiene tres inconvenientes, por un lado, los crioprotectores son tóxicos y por otro lado, durante la disminución de la temperatura se produce la formación de cristales de hielo que pueden provocar daño a la membrana plasmática del espermatozoide. Finalmente, el procedimiento en si es largo y tedioso.

En años recientes, ha sido renovada por los investigadores una de las primeras técnicas de criopreservación celular desarrollada: la vitrificación (Luyet y col., 1937). Esta técnica implica la criopreservación de especies celulares empleando altas concentraciones de crioprotector y la inmersión directa en LN2, provocando de esta forma el pasaje directo de la solución a una fase vítrea libre de cristales de hielo (Rall y Fahy, 1985). Esta metodología presenta la gran ventaja de evitar la formación de cristales de hielo, pero debe ser empleada con cierto cuidado ya que la alta concentración de crioprotectores es tóxica. Una ventaja adicional es que la técnica es sencilla y rápida.

Hoy en día, la vitrificación está ampliamente extendida para la criopreservación de ovocitos y embriones humanos. En los últimos años han sido publicados algunos estudios en los que se vitrificaron espermatozoides humanos en contenedores plásticos con y sin uso de sacarosa como crioprotector (Vickram y col., 2025). Pese a ello todavía la mayoría de los laboratorios de reproducción asistida emplean el congelamiento lento para la criopreservación de espermatozoides.

Es sabido que la criopreservación puede provocar un aumento de los niveles de fragmentación del ADN espermático en una población celular (Esteves y col., 2025). Es por ello que en el presente trabajo se evaluaron los niveles de fragmentación de ADN que inducían la técnica de vitrificación y el congelamiento lento, el cual representa la técnica empleada en forma estándar en el laboratorio de andrología de Invida Medicina Reproductiva y Medicina Reproductiva Fertilis para criopreservar muestras de espermatozoides de pacientes.

La comparación mostró que los valores de TUNEL fueron significativamente mayores para la muestra post descongelamiento lento comparándolos con los de la muestra post desvitrificación, demostrando que la vitrificación resultó menos perjudicial para los espermatozoides que el congelamiento lento. Esto tiene un impacto directo en los resultados del laboratorio de reproducción asistida de alta complejidad ya que espermatozoides con ADN fragmentado producirán embriones de mala calidad (Evgeni y col., 2023).

Es importante destacar que, dado que la mayoría de los laboratorios de reproducción asistida siguen empleando el congelamiento lento para la criopreservación de espermatozoides, se debe recomendar el uso de técnicas que reduzcan el porcentaje de estos espermatozoides afectados. Entre ellas se pueden mencionar las columnas de Anexina V (Garrido y Gil Juliá, 2024) y los chips de microfluidos (Bhat y col., 2024).

Un dato adicional muy importante es que la movilidad espermática presentó también mejores resultados para la vitrificación. Por otra parte, si bien en este experimento la recuperación espermática post desvitrificación fue significativamente menor que la inicial y el obtenido post *swim-up* y post congelamiento lento, se debe puntualizar que este es un artificio técnico provocado por la decisión de utilizar un bajo volumen de muestra para criopreservar.

Un hallazgo importante que se desprende del presente trabajo es que el congelamiento lento aumenta en forma relevante los niveles de células espermáticas con su ADN dañado. Esta técnica es la que se emplea para criopreservar espermatozoides obtenidos mediante biopsia testicular. Se ha observado que los embriones producidos con este tipo de espermatozoides presentan una alta tasa de fragmentación celular, la cual correlaciona con baja calidad embrionaria y bajas tasas de embarazo a partir de los mismos. Hasta el presente, se ha especulado que esto se debe al origen de los espermatozoides, ya que esta población celular aún no ha finalizado la maduración. A partir de los resultados del presente trabajo, se puede pensar que la mala calidad embrionaria observada podría deberse a la técnica de criopreservación más que al origen espermático. Para determinar esto, ambos laboratorios de reproducción asistida comenzarán un estudio diseñado a tal efecto.

## CONCLUSIONES

La vitrificación de espermatozoides es una técnica de criopreservación que puede llevarse a cabo obteniendo buenos resultados.

El congelamiento lento provoca un aumento significativo de los niveles de fragmentación del ADN espermático. Por otra parte, muestra un menor porcentaje de espermatozoides móviles progresivos.

Sería recomendable realizar una selección espermática mediante el uso de técnicas que reduzcan el porcentaje de estos espermatozoides afectados en las muestras criopreservadas por congelamiento lento para disminuir la concentración de espermatozoides con ADN fragmentado.

Se debe estudiar en forma exhaustiva la correlación entre los niveles de fragmentación del ADN espermático de los espermatozoides post criopreservación y la calidad de los embriones producidos in vitro.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal, A., Majzoub, A., Esteves, S. C., Ko, E., Ramasamy, R., & Zini, A. (2016). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: Practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, 5(6), 935–950.
2. Agarwal, A., Barbăroşie, C., Ambar, R., & Finelli, R. (2020a). The impact of single- and double-strand DNA breaks in human spermatozoa on assisted reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3882.
3. Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. *The Lancet*, 397(10271), 319–333.
4. Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Panner Selvam, M. K., Cho, C. L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosie, C., Parekh, N., Alves, M. G., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., Robert, K. A., & Shah, R. (2020b). Sperm DNA fragmentation: A new guideline for clinicians. *The World Journal of Men's Health*, 38(4), 412–471.
5. Agarwal, A., Panner Selvam, M. K., Baskaran, S., & Cho, C. L. (2019). Sperm DNA damage and its impact on male reproductive health: A critical review for clinicians, reproductive professionals and researchers. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 19(6), 443–457.
6. Ahmadi, H., Aghebati-Maleki, L., Rashidiani, S., Csabai, T., Nnaemeka, O. B., & Szekeres-Bartho, J. (2023). Long-term effects of ART on the health of the offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13564.
7. Ayad, B., Omolaoye, T. S., Louw, N., Ramsunder, Y., Skosana, B. T., Oyeipo, P. I., & Du Plessis, S. S. (2022). Oxidative stress and male infertility: Evidence from a research perspective. *Frontiers in Reproductive Health*, 4, 822257.
8. Basic, M., Mitic, D., Krstic, M., & Cvetkovic, J. (2023). Tobacco and alcohol as factors for male infertility: A public health approach. *Journal of Public Health*, 45(2), e241–e249.
9. Bhat, G. R., Lone, F. A., & Dalal, J. (2024). Microfluidics—A novel technique for high-quality sperm selection for greater ART outcomes. *FASEB BioAdvances*, 6(10), 406–423.
10. Boomsma, C. M., Cohlen, B. J., & Farquhar, C. (2019). Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019(10), CD004507.
11. Campbell, K., Zarli, M., Schuppe, K., Wong, R., Rahman, F., & Ramasamy, R. (2023). Sexual and reproductive health among men with cystic fibrosis. *Urology*, 179, 9–15.
12. Cariboni, A., & Balasubramanian, R. (2021). Kallmann syndrome and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: The role of semaphorin signaling on GnRH neurons. In M. B. Aminoff & F. Boller (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 182, pp. 307–315). Elsevier.
13. Carson, S. A., & Kallen, A. N. (2021). Diagnosis and management of infertility: A review. *JAMA*, 326(1), 65–76.

14. Chen, J., Chen, J., Fang, Y., Shen, Q., Zhao, K., Liu, C., & Zhang, H. (2023). Microbiology and immune mechanisms associated with male infertility. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1139450.
15. Choe, J., & Shanks, A. L. (2023). In vitro fertilization. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563133/>
16. Colaco, S., & Sakkas, D. (2018). Paternal factors contributing to embryo quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *35*(11), 1953–1968.
17. Eisenberg, M. L., Esteves, S. C., Lamb, D. J., Hotaling, J. M., Giwercman, A., Hwang, K., & Cheng, Y. S. (2023). Male infertility. *Nature Reviews Disease Primers*, *9*(1), 49.
18. Esteves, S. C., Santi, D., & Simoni, M. (2020). An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrology*, *8*(1), 53–81.
19. Esteves, S. C., Viana, M. C., Reis, A. B., Lira, F. T., Neto, Teixeira, T. A., Camarço, J. P., Gröner, M., Paula, A. J. T., Stein, A. C., Mulato, M. G. F., Fraietta, R., & Hallak, J. (2025). Male Infertility: Treatment Approach - A Committee Opinion. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*, *51*(6), e20250224.
20. Evgeni, E., Sabbaghian, M., Saleh, R., Gül, M., Vogiatzi, P., Durairajanayagam, D., Jindal, S., Parmegiani, L., Boitrelle, F., Colpi, G., & Agarwal, A. (2023). Sperm DNA fragmentation test: Usefulness in assessing male fertility and assisted reproductive technology outcomes. *Panminerva Medica*, *65*(2), 135–147.
21. Fan, Y., & Silber, S. J. (2002). Y chromosome infertility. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, & R. A. Pagon (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1339/>
22. Finelli, R., Mottola, F., & Agarwal, A. (2021). Impact of alcohol consumption on male fertility potential: A narrative review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(1), 328.
23. Garrido, N., & Gil Juliá, M. (2024). The use of non-apoptotic sperm selected by magnetic activated cell sorting (MACS) to enhance reproductive outcomes: What the evidence says. *Biology*, *13*(1), 30.
24. Gisbert Iranzo, A., Cano-Extremera, M., Hervás, I., Falquet Guillem, M., Gil Juliá, M., Navarro-Gomezlechón, A., Pacheco-Rendón, R. M., & Garrido, N. (2025). Sperm selection using microfluidic techniques significantly decreases sperm DNA fragmentation (SDF), enhancing reproductive outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Biology*, *14*(7), 792.
25. Gode, F., Gürbüz, A. S., Tamer, B., Pala, I., & Isik, A. Z. (2020). The effects of microfluidic sperm sorting, density gradient and swim-up methods on semen oxidation reduction potential. *Urology Journal*, *17*(4), 397–401.
26. Hanevik, H. I., & Hessen, D. O. (2022). IVF and human evolution. *Human Reproduction Update*, *28*(4), 457–479.
27. Huyghe, E., Methorst, C., & Faix, A. (2023). Varicocele and male infertility. *Progrès en Urologie*, *33*(13), 624–635.

28. Jain, M., & Singh, M. (2023). Assisted reproductive technology (ART) techniques. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563133/>
29. Kaltsas, A. (2023). Oxidative stress and male infertility: The protective role of antioxidants. *Medicina*, 59(10), 1769.
30. Karavolos, S. (2021). Sperm DNA fragmentation. *Seminars in Reproductive Medicine*, 39(5–6), 194–199.
31. Krege, S., Oing, C., & Bokemeyer, C. (2023). Testicular tumors. *Deutsches Ärzteblatt International*, 120(49), 843–854.
32. Kruger, T. F., Menkveld, R., Stander, F. S., Lombard, C. J., Van der Merwe, J. P., van Zyl, J. A., & Smith, K. (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 46(6), 1118–1123.
33. Lopes, S., Sun, J. G., Jurisicova, A., Meriano, J., & Casper, R. F. (1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 69(3), 528–532.
34. Lopez Dacal, J., Prada, S., Correa Brito, L., Ropelato, M. G., Ballerini, M. G., Rodriguez, M. E., Gutiérrez, M. E., Soria, M., Morán, L., Ferraro, C., Bedecarrás, P., Drelichman, G., Aversa, L., Bergadá, I., Rey, R. A., & Grinspon, R. P. (2023). Testicular dysfunction at diagnosis in children and teenagers with haematopoietic malignancies improves after initial chemotherapy. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1135467.
35. Luyet BJ. The vitrification of organics colloids and of protoplasm. *Biodynamica* 1937, 1: 1-14.
36. Marinaro, J., & Schlegel, P. N. (2025). Sperm DNA fragmentation and fertility. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1469, pp. 305–332). Springer.
37. Martínez, E., Bezazián, C., Bezazián, A., Lindl, K., Peliquero, A., Cattaneo, A., Gnocchi, D., Irigoyen, M., Tessari, L., & Martínez, A. G. (2021). Sperm DNA fragmentation and male age: Results of in vitro fertilization treatments. *JBRA Assisted Reproduction*, 25(4), 533–539.
38. Miller, D., & Vukina, J. (2020). Recent advances in clinical diagnosis and treatment of male factor infertility. *Postgraduate Medicine*, 132(sup4), 28–34.
39. Ozimic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. (2023). Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), 4716–4734.
40. Parrella, A., Keating, D., Cheung, S., Xie, P., Stewart, J. D., Rosenwaks, Z., & Palermo, G. D. (2019). A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(10), 2057–2066.
41. Polge C, Rowson LEA. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -7°C. *Nature* 1952, 169: 626-627.
42. Qiu, Y., Yang, H., Li, C., & Xu, C. (2020). Progress in research on sperm DNA fragmentation. *Medical Science Monitor*, 26, e918746.
43. Rall WF, Fahy CM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985, 313: 573-575.

44. Riva, N. S., Ruhlmann, C., Iaizzo, R. S., Marcial López, C. A., & Martínez, A. G. (2018). Comparison of slow freezing with vitrification for human sperm cryopreservation. *JBRA Assisted Reproduction*, 22(4), 331–337.
45. Sá, R., Ferraz, L., Barros, A., & Sousa, M. (2023). The Klinefelter syndrome and testicular sperm retrieval outcomes. *Genes*, 14(3), 647.
46. Shah, P. K., & Gher, J. M. (2023). Human rights approaches to reducing infertility. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 162(1), 368–374.
47. Sharma, A., Minhas, S., Dhillon, W. S., & Jayasena, C. N. (2021). Male infertility due to testicular disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 106(2), e442–e459.
48. Sharma, R., Iovine, C., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). TUNEL assay—Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia*, 53(2), e13738.
49. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191.
50. Souza, M. D. C. B., Silva, L. A. B. D., Sequeira, F. F., Azevedo Antunes, R., & Souza, M. M. (2023). The management of infertility for primary care physicians. *Women & Health*, 63(3), 194–203.
51. Takács, T., Szabó, A., & Kopa, Z. (2025). Recent trends in the management of varicocele. *Journal of Clinical Medicine*, 14(15), 5445.
52. Tamburrino, L., Traini, G., Marcellini, A., Vignozzi, L., Baldi, E., & Marchiani, S. (2023). Cryopreservation of human spermatozoa: Functional, molecular and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4656.
53. Thakker, S., Persily, J., & Najari, B. B. (2020). Kallman syndrome and central non-obstructive azoospermia. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 34(6), 101475.
54. Vargas-Tominaga, L., Alarcón, F., Vargas, A., Bernal, G., Medina, A., & Polo, Z. (2020). Associated factors to pregnancy in intrauterine insemination. *JBRA Assisted Reproduction*, 24(1), 66–69.
55. Vaughan, D. A., & Sakkas, D. (2019). Sperm selection methods in the 21st century. *Biology of Reproduction*, 101(6), 1076–1082.
56. Venditti, M., & Minucci, S. (2022). Male reproduction: Regulation, differentiation and epigenetics. *Genes*, 13(6), 1001.
57. Vickram, A. S., Prasanth, C., Bharath, S., Jenila Rani, D., Mathan Muthu, C. M., & Bhavani Sowndharya, B. (2025). Advancements in cryopreservation techniques for human gametes and embryos: Novel cryoprotectants and their influence on fertility preservation. *Cryo Letters*, 46(4), 213–230.
58. Vockel, M., Riera-Escamilla, A., Tüttelmann, F., & Krausz, C. (2021). The X chromosome and male infertility. *Human Genetics*, 140(1), 203–215.

59. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (6th ed.). WHO Press.