

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
  - a. Título.
  - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
  - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
  - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
  - e. Introducción.
  - f. Material y métodos.
  - g. Resultados.
  - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
  7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
  8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
    - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaria de SAMeR: info@samer.org.ar

## Análisis comparativo del congelamiento lento y la vitrificación para la criopreservación de espermatozoides

Natalí S Riva, Carla A Marcial López, Gustavo Martínez, Rocío S laizzo, Mariana Artola, Claudio Ruhlmann

Fertilidad San Isidro. Buenos Aires, Argentina.

**Reproducción 2016;31:7-14**

### Resumen

*El congelamiento lento es la técnica más empleada para la criopreservación de espermatozoides, pero recientemente ha comenzado a utilizarse la vitrificación como alternativa obteniéndose resultados dispares. Por otra parte, muchos estudios reportan que el daño en el ADN del espermatozoide se correlaciona con un pobre desarrollo embrionario, falla en la implantación, aborto espontáneo y defectos congénitos en la descendencia. El presente trabajo tiene como objetivo comparar la eficiencia del congelamiento lento y la vitrificación de espermatozoides, estableciendo además los niveles de fragmentación de ADN luego de ambas técnicas de criopreservación. En el experimento 1 se emplearon 6 muestras de semen para comparar la recuperación espermática luego del congelamiento lento y la vitrificación de esper-*

*matozoides. En el experimento 2 se emplearon 10 muestras de semen para comparar la fragmentación de ADN espermático causada por ambos métodos de criopreservación. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de Kruskal-Wallis.*

*En el experimento 1 no se encontraron diferencias significativas en la concentración espermática recuperada, pero la vitrificación presentó mayor cantidad de espermatozoides móviles grado A y grado B ( $5,7 \pm 2,3$  vs  $12,2 \pm 3,4$ ;  $13,7 \pm 7,8$  vs  $24,8 \pm 11,7$ ) y menor cantidad de espermatozoides inmóviles ( $68,8 \pm 13,7$  vs  $54,5 \pm 12,2$ ) que el congelamiento lento. En el experimento 2 la movilidad presentó diferencias significativas en favor de las muestras inicial y post-desvitrificación para los valores de movilidad grado A y grado B ( $9,2 \pm 6,3$  vs  $4,5 \pm 1,8$  vs  $13,9 \pm 6,6$ ;  $33,2 \pm 11,0$  vs  $14,8 \pm 3,9$  vs  $23,4 \pm 8,1$ ) e inmóviles ( $46,3 \pm 13,7$  vs  $70,8 \pm 6,6$  vs  $54,2 \pm 10,0$ ). La fragmentación de ADN espermático fue significativamente mayor en la muestra post-congelamiento lento en comparación con los de la muestra post-gradiente y post-desvitrificación ( $9,8 \pm 4,7$  vs  $44,7 \pm 11,7$  vs  $15,9 \pm 6,0$ ). Nuestros resultados muestran*

**Correspondencia:** Gustavo Martínez  
Correo electrónico: agmartinez@fibertel.com.ar

que la vitrificación de espermatozoides es una técnica que puede llevarse a cabo con buenos resultados y que provoca menor daño al ADN espermático.

**Palabras claves.** Espermatozoides, congelamiento lento, vitrificación, fragmentación de ADN.

## Comparative analysis of slow freezing and vitrification for sperm cryopreservation

### Summary

*Slow freezing is the standard technique used for sperm cryopreservation. Even though vitrification has recently become an alternative still showing uneven results. Many studies report that sperm DNA damage correlates to poor embryo development, miscarriage and congenital birth defects. Our study aims to compare the efficiency of slow freezing versus sperm vitrification, and to determine the level of DNA fragmentation after both cryopreservation techniques. In experiment 1, 6 semen samples were used to compare sperm concentration recovery after slow freezing and sperm vitrification. In experiment 2, 10 samples were used to compare sperm concentration, motility and DNA fragmentation after both cryopreservation techniques. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis Test. In experiment 1, no significant differences were obtained in sperm concentration recovery, although vitrification showed a higher grade A and grade B motility sperm count ( $5,7 \pm 2,3$  vs  $12,2 \pm 3,4$ ;  $13,7 \pm 7,8$  vs  $24,8 \pm 11,7$ ), and lower immotile sperm count ( $68,8 \pm 13,7$  vs  $54,5 \pm 12,2$ ) than slow freezing. In experiment 2, sperm motility showed significant differences between the fresh, slow frozen and vitrified samples for grade A and grade B values ( $9,2 \pm 6,3$  vs  $4,5 \pm 1,8$  vs  $13,9 \pm 6,6$ ;  $33,2 \pm 11,0$  vs  $14,8 \pm 3,9$  vs  $23,4 \pm 8,1$ ) and for immotile sperm ( $46,3 \pm 13,7$  vs  $70,8 \pm 6,6$  vs  $54,2 \pm 10,0$ ). Sperm DNA fragmentation was significantly higher in the slow freezing sample compared to post-gradient and vitrification samples ( $9,8 \pm 4,7$  vs  $44,7 \pm 11,7$  vs  $15,9 \pm 6,0$ ). Our results show that sperm vitrification may be an alternative to slow freezing with better recovery results and less DNA damage.*

**Key words.** Sperm slow freezing, sperm vitrification, sperm DNA fragmentation.

## Introducción

La criopreservación de espermatozoides es una herramienta fundamental en reproducción asistida ya que permite optimizar los tratamientos de esterilidad y preservar la fertilidad en pacientes que, potencialmente, pueden perderla por tratamientos agresivos como radioterapia, quimioterapia o cirugías invasivas (Sanger y col, 1992).

Actualmente el congelamiento lento es la metodología más extendida para la criopreservación de espermatozoides ya que permite la conservación de grandes volúmenes de muestras de semen, con resultados satisfactorios sobre la vitalidad y motilidad después del descongelamiento (Donnez y Kim, 2011; Fuller y col, 2004).

Recientemente, se ha desarrollado la vitrificación de espermatozoides como alternativa al congelamiento lento, la cual evita la formación de hielo intracelular ya que la solución pasa directamente a un estado vítreo en contacto con el nitrógeno líquido (Isachenko y col, 2003; Isachenko y col, 2004).

Un creciente número de estudios reportan que el daño en el ADN de células espermáticas se relaciona con un pobre desarrollo embrionario, así como también falla en la implantación, aborto espontáneo y defectos congénitos en la descendencia (Cohen y col 2009; González Torres y Rawe, 2010; Lewis y col, 2013; Seli y Sakkas, 2005).

Aún es poco conocido el efecto que provoca la criopreservación sobre la integridad del ADN espermático.

El objetivo del presente trabajo fue comparar la eficiencia del congelamiento lento y la vitrificación de espermatozoides y determinar los niveles de fragmentación del ADN que provoca la criopreservación por ambas técnicas.

## Materiales y métodos

### Congelamiento lento de espermatozoides

La muestra de semen fue colocada en un tubo de centrifuga de 15 ml (*Nunc*, Dinamarca) y se le agregó *Test Yolk Buffer* (*Irvine*, EE.UU.) en proporción 1:1 goteando lentamente y mezclando hasta lograr una solución homogénea. La solución obtenida se fraccionó en partes iguales en 4 crioviales (*Nunc*, Dinamarca) previamente rotulados con el número de identificación de la muestra.

Los crioviales fueron colocados a 4-8°C por 60 min. Pasado ese tiempo, se los llevó a -12°C

a -18°C durante 5 min; a continuación, el mismo tiempo a vapores de nitrógeno (-170°C a -180°C). Una vez finalizado el procedimiento fueron sumergidos en nitrógeno líquido (-196°C) en una varilla de aluminio rotulada para su almacenamiento (Nallella y col, 2004; Royere y col, 1996).

Para el descongelamiento de las muestras, las varillas fueron retiradas de los tanques de nitrógeno y los crioviales fueron colocados sobre una platina térmica a 37°C hasta alcanzar el estado líquido. Luego, el contenido de los crioviales fue colocado en un tubo de centrifuga de 15 ml diluyendo con una solución de HTF modificado (mHTF, Irvine, EE.UU.) contenido 3% de suero sintético (SSS, Irvine, EE.UU.) en proporción 1:1 a 37°C, mezclando por agitación lenta. Se centrifugó por 10 min a 300 grs, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 1 ml de mHTF+3%SSS. Se procesó la muestra resultante mediante un gradiente de separación 50% / 90% (Isolate, Irvine, EE.UU.), a continuación se le realizó un lavado y se resuspendió en 0,4 ml de mHTF+3%SSS.

#### Vitrificación de espermatozoides

Se empleó el protocolo descrito por Isachenko y col (2005) con modificaciones.

A cada una de las muestras de semen se le realizó un gradiente 50% / 90% tal cual se describió en la sección anterior. La solución obtenida fue diluida con Sacarosa 0,5M (Sigma, EE.UU.) en proporción 1:1. Luego se incubó 5 min a 37°C y se preparó un contenedor con nitrógeno líquido al cual se le insertó una rejilla para recibir la muestra procesada. La criopreservación se llevó a cabo formando perlas de 35  $\mu$ l, las cuales se obtuvieron posicionando la pipeta en ángulo de 45° a 10 cm de la superficie del nitrógeno. Se dejó caer una gota cada 5 seg esperando que se solidifique y se deposite en el fondo de la rejilla. Una vez finalizado este procedimiento, las perlas se colocaron en crioviales y fueron almacenadas en el tanque de nitrógeno líquido por un mínimo de 24 hs.

Para la desvitrificación las perlas fueron sumergidas en 5 ml de mHTF+3%SSS a 37°C agitando suavemente durante 5 seg. La suspensión resultante fue incubada a 37°C durante 10 min, posteriormente se centrifugó 5 min a 350 grs y finalmente se resuspendió el *pellet* en 0,4 ml de mHTF+3%SSS.

#### Determinación de la fragmentación del ADN espermático

Para determinar los niveles de fragmentación del ADN espermático se empleó la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling Assay*) descrita por López y col (1998). Para ello se sumergieron los portaobjetos especiales (*Teflon Printed Slide para TUNEL*, EMS, EE.UU.) por al menos 2 hs en Polilicina 0,1% (Sigma, EE.UU.), luego de lo cual fueron enjuagados con agua ultrapura (Sigma, EE.UU.) y secados a temperatura ambiente.

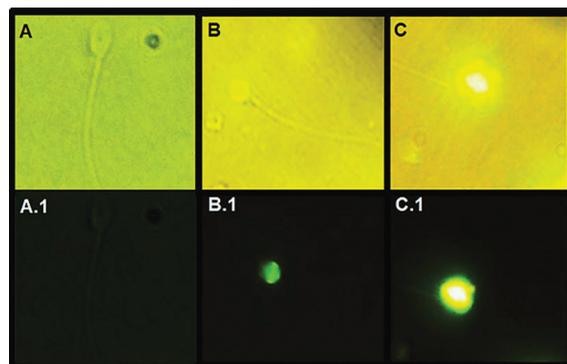
Las muestras procesadas que fueron seleccionadas para este estudio se fijaron con formaldehído 37% (Sigma, EE.UU.) y se almacenaron a 4-8°C hasta su utilización.

Para la evaluación de la fragmentación, 30  $\mu$ l de la muestra fueron sembradas por duplicado en los portaobjetos, los cuales fueron colocados en cámara húmeda durante 24 hs a 4-8°C. Pasado ese tiempo, las muestras fueron lavadas 3 veces durante 5 min con 10  $\mu$ l de PBS 1x (Irvine, EE.UU.). Luego se agregó Metanol (Sigma, EE.UU.) por 90 seg y se repitieron los 3 lavados con PBS 1x. Se colocó 10  $\mu$ l de solución de bloqueo PBS+0,5%BSA (Albúmina Sérica Bovina, Sigma, EE.UU.) dejándola por 50 min dentro de la cámara húmeda a 4-8°C, posteriormente, se realizaron otros 3 lavados con PBS 1x. A cada pocillo se le añadió una mezcla de 4,5  $\mu$ l de label y 3,5  $\mu$ l de enzima (*In situ Death Cell Detection kit*, Roche, EE.UU.) protegidos de la luz, y los portaobjetos se colocaron en cámara húmeda por 1 hs sobre platina térmica. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con 10  $\mu$ l de PBS 1x y se dejó secar por completo a temperatura ambiente, siempre evitando exposición a luz. Por último, se agregó 5  $\mu$ l de agente de montaje *Vecta-Shield* (Vector Lab, EE.UU.) a cada pocillo y por encima se colocó un cubreobjetos de 24 x 50 mm.

Finalmente, se observó en el microscopio de fluorescencia (*Mikoba S320*, China) a un aumento de 100X con aceite de inmersión.

Se registró el número de espermatozoides apoptóticos en un recuento de 200 espermatozoides totales. Se consideraron positivos aquellos espermatozoides con fluorescencia mayor al 50% en citoplasma, el resto fueron consideradas negativas (Figura 1).

**Figura 1.** Espermatozoides y células no espermáticas con diferentes marcaciones para TUNEL.



A: Espermatozoide negativo en luz blanca; A.1: Espermatozoide negativo con 0% de fluorescencia bajo luz UV. B: Espermatozoide negativo con < 50% de fluorescencia en luz blanca; B.1: Espermatozoide negativo con < 50% de fluorescencia en luz UV. C: Espermatozoide positivo con > 50% de fluorescencia en luz blanca; C.1: Espermatozoide positivo con > 50% de fluorescencia en luz UV.

### Diseño experimental

Se utilizaron 16 muestras de semen recibidas en el Laboratorio de Andrología de Fertilidad San Isidro entre febrero y mayo de 2015 donadas para investigación. Los donantes firmaron el consentimiento correspondiente.

Los criterios de inclusión fueron:

- Volumen de semen:  $\geq 1,5$  ml.
- Concentración espermática:  $\geq 20 \times 10^6$  espermatozoides/ml.
- Movilidad espermática A+B:  $\geq 25\%$ .

*Experimento 1:* Análisis comparativo de recuperación espermática post-congelamiento lento y vitrificación de espermatozoides

Para evaluar la recuperación espermática luego de realizar congelamiento lento y vitrificación de espermatozoides, se utilizaron 6 muestras de semen.

Se registró la concentración y movilidad espermática en fresco y luego se dividió el volumen de las muestras en partes iguales, procediendo a la criopreservación por medio de las dos técnicas mencionadas.

Luego de una semana en nitrógeno líquido, las muestras fueron procesadas según el protocolo correspondiente. Se evaluaron la concentración y la movilidad espermática recuperada.

*Experimento 2:* Análisis comparativo de la fragmentación de ADN espermático causada por el congelamiento lento y la vitrificación

Para llevar a cabo la comparación en la fragmentación de ADN causada por el procedimiento de congelamiento lento y vitrificación de espermatozoides, se emplearon 10 muestras de semen.

Cada una de las muestras frescas fue analizada mediante la técnica de TUNEL registrándose el valor de fragmentación previo a la criopreservación. Luego, fueron divididas en volúmenes equivalentes y las fracciones fueron sometidas a congelamiento lento o vitrificación. Al concluir los procedimientos fueron colocadas en tanques de nitrógeno líquido.

Finalmente todas las muestras fueron descongeladas y se registró el nivel de fragmentación de ADN espermático mediante la técnica de TUNEL de cada una de ellas para compararlas con los resultados iniciales.

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un test de Kruskal-Wallis, empleando el programa *Graph Pad Instat*. Se consideró que las diferencias fueron significativas a partir de un valor de  $p < 0,05$ .

### Resultados

*Experimento 1:* Análisis comparativo de recuperación espermática post-congelamiento lento y vitrificación de espermatozoides

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

Luego del congelamiento lento y la vitrificación no se encontraron diferencias significativas

**Tabla 1.** Parámetros espermáticos analizados previos a la criopreservación de las muestras seminales completas.

Número de muestras	6
Volumen (ml)	$3,5 \pm 0,9$
Concentración espermática ( $10^6$ /ml)	$66,3 \pm 18,7$
Movilidad A+B (%)	$52,3 \pm 13,9$
Movilidad A (%)	$16,8 \pm 15,4$
Movilidad B (%)	$35,5 \pm 16,7$
Movilidad C (%)	$8,2 \pm 6,2$
Inmóviles (%)	$39,5 \pm 13,8$
Concentración post-gradiente ( $10^6$ /ml)	$44,5 \pm 20,0$
Movilidad A post-gradiente (%)	$90,8 \pm 11,6$

en la concentración espermática recuperada, pero las muestras post-desvitrificación presentaron mayor cantidad de espermatozoides móviles grado A y B, y menor cantidad de espermatozoides inmóviles que aquellas post-congelamiento lento (Tabla 2).

*Experimento 2:* Análisis comparativo de la fragmentación de ADN espermático causada por el congelamiento lento y la vitrificación

Los parámetros seminales de las muestras empleadas para el presente experimento se detallan en la Tabla 3.

No se encontraron diferencias significativas en la recuperación espermática entre los distintos tipos de muestras (Tabla 4).

Con respecto a la movilidad, se observaron diferencias significativas en favor de las muestras inicial y post-desvitrificación para los valores de movilidad A, B e inmóviles (Tabla 5).

La técnica de TUNEL presentó valores significativamente mayores para la muestra post-congelamiento lento en comparación con los de la muestra inicial y post-desvitrificación (Tabla 6).

**Tabla 2.** Comparación de la concentración y la movilidad post-criopreservación luego de emplear congelamiento lento y vitrificación de espermatozoides.

Técnica de criopreservación	Congelamiento	Vitrificación
Concentración post-criopreservación ( $10^6/ml$ )	$29,8 \pm 9,2$	$26,5 \pm 9,0$
Movilidad A+B post-criopreservación (%)	$21,3 \pm 9,1$ a	$37,0 \pm 12,9$ b
Movilidad A post-criopreservación (%)	$5,7 \pm 2,3$ a	$12,2 \pm 3,4$ b
Movilidad B post-criopreservación (%)	$13,7 \pm 7,8$ a	$24,8 \pm 11,7$ b
Movilidad C post-criopreservación (%)	$9,8 \pm 4,7$	$8,7 \pm 2,7$
Inmóviles post-criopreservación (%)	$68,8 \pm 13,7$ a	$54,5 \pm 12,2$ b

(a,b) Difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.** Parámetros seminales analizados previo a la criopreservación.

Número de muestras	10
Volumen (ml)	$2,5 \pm 0,5$
Concentración espermática ( $10^6/ml$ )	$65,3 \pm 34,9$
Movilidad A+B (%)	$52,4 \pm 13,5$
Movilidad A (%)	$9,2 \pm 6,3$
Movilidad B (%)	$33,2 \pm 11,0$
Movilidad C (%)	$11,3 \pm 7,5$
Inmóviles (%)	$46,3 \pm 13,7$
Concentración post-gradiente ( $10^6/ml$ )	$82,0 \pm 63,5$
Movilidad A post-gradiente (%)	$88,5 \pm 7,8$
Valor de TUNEL pre-criopreservación (%)	$9,8 \pm 4,7$

**Tabla 4.** Comparación de concentración espermática en las diferentes muestras.

Tipo de muestra	Inicial	Post-gradiente	Post-congelamiento	Post-desvitrificado
Concentración espermática ( $10^6/ml$ )	$65,3 \pm 34,9$	$82,0 \pm 63,5$	$40,2 \pm 26,4$	$44,3 \pm 13,6$

**Tabla 5.** Comparación de la movilidad espermática luego de la criopreservación.

Tipo de muestra	Inicial	Post-congelamiento	Post-desvitrificado
Movilidad A+B (%)	$52,4 \pm 13,5$ a	$19,3 \pm 4,9$ b	$37,3 \pm 11,0$ a
Movilidad A (%)	$9,2 \pm 6,3$ a	$4,5 \pm 1,8$ b	$13,9 \pm 6,6$ a
Movilidad B (%)	$33,2 \pm 11,0$ a	$14,8 \pm 3,9$ b	$23,4 \pm 8,1$ a
Movilidad C (%)	$11,3 \pm 7,5$	$9,9 \pm 4,5$	$8,5 \pm 3,3$
Inmóviles (%)	$46,3 \pm 13,7$ a	$70,8 \pm 6,6$ b	$54,2 \pm 10,0$ a

(a,b) Difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

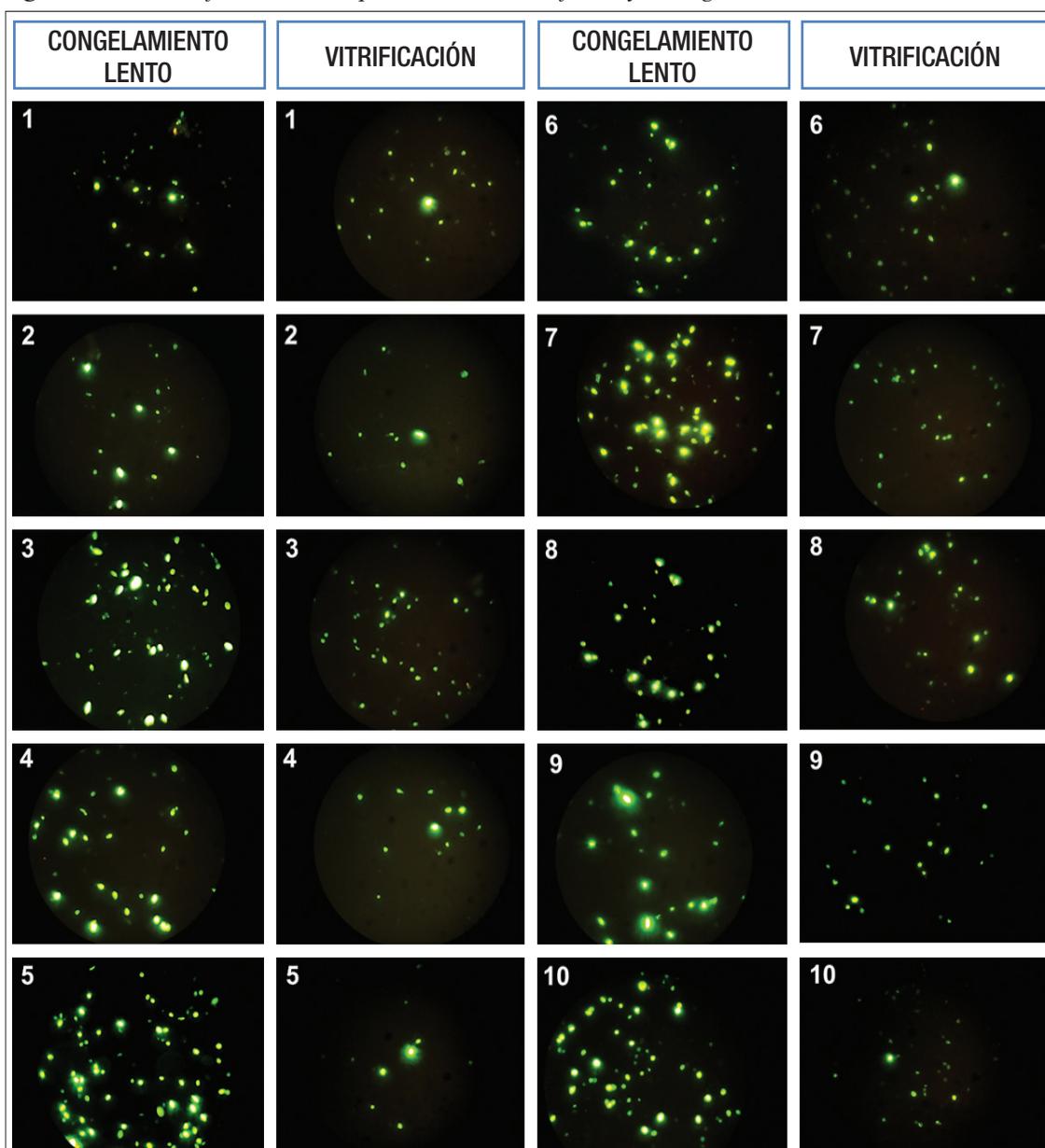
**Tabla 6.** Comparación de los valores de TUNEL en las diferentes muestras.

Tipo de muestra	Post-gradiente	Post-congelamiento	Post-desvitrificado
Valor de TUNEL (%)	9,8 ± 4,7 a	44,7 ± 11,7 b	15,9 ± 6,0 a

(a,b) Difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 2 se observa la marcación fluorescente obtenida aplicando la técnica de TUNEL a las muestras post-congelamiento lento y post-desvitrificación.

**Figura 2.** Marcación fluorescente de espermatozoides desvitrificados y descongelados (100X).



## 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 1950 se recurre a la criopreservación de espermatozoides de diferentes especies animales mediante el congelamiento lento (Polge y Rowson, 1950), el cual representa actualmente la técnica empleada en forma estándar en los laboratorios de andrología para criopreservar muestras de espermatozoides humanos.

Esta técnica presenta algunos inconvenientes; por un lado, los crioprotectores son tóxicos, 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 y, finalmente, el procedimiento en sí es largo y tedioso.

En años recientes, ha vuelto a utilizarse 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 nitrógeno líquido, 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 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 oocitos y embriones humanos. En la última década, han sido publicados algunos estudios en los que se vitrificaron espermatozoides humanos con cierto grado de éxito (Isachenko y col, 2002). Estos trabajos resultaron muy difíciles de ser replicados por otros investigadores, quienes recién lograron tasas aceptables de recuperación espermática cuando modificaron los soportes plásticos que contienen los espermatozoides y/o agregaron sacarosa al medio de criopreservación (Isachenko y col 2008).

Es sabido que la criopreservación puede provocar un aumento de los niveles de apoptosis en una población celular (Ortega y col, 2010). Es por ello que en el presente trabajo se evaluaron los niveles de fragmentación de ADN que inducían el congelamiento lento y la vitrificación.

La comparación mostró que los valores de TUNEL fueron significativamente mayores para la muestra post-congelamiento lento comparándolos con los obtenidos en la muestra inicial y post-desvitrificación, demostrando que la vitrificación resultó ser menos perjudicial para los espermatozoides. 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 (Benchaib y col, 2003).

Un dato adicional relevante sobre la vitrificación es que presentó una movilidad espermática significativamente mayor que la alcanzada por el congelamiento lento. Esto es de gran importancia para el laboratorio de fecundación asistida ya que los espermatozoides con movilidad progresiva son los que se seleccionan para realizar los tratamientos de alta y baja complejidad. Adicionalmente, el hecho de contar con mayor cantidad de espermatozoides móviles progresivos podrá determinar el tipo de procedimiento de fecundación asistida a realizar ya que, por ejemplo, ante un número reducido de espermatozoides, la técnica a indicar será ICSI, la cual tiene algunas desventajas con respecto al FIV convencional (Dumoulin y col, 2000; Shalom-paz y col, 2011).

Un hallazgo importante que se desprende del presente trabajo es que el congelamiento lento aumenta en forma significativa los niveles de células espermáticas con fragmentación de ADN. 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 (Benchaib y col, 2007). Hasta el presente, se ha especulado que esto se debe al origen de los espermatozoides, ya que esta población celular aún no ha finalizado su 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 utilizada más que al origen espermático. Para determinar esto, el laboratorio de fecundación asistida de Fertilidad San Isidro ha comenzado un estudio diseñado a tal efecto.

A partir de nuestros resultados podemos concluir que la vitrificación de espermatozoides es una técnica de criopreservación que puede llevarse a cabo obteniendo buenos resultados y que provoca menor daño al ADN espermático.

## Referencias

1. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18: 1023-1028.
2. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, François Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *FertilSteril* 2007; 87: 93-100.
3. Cohen P, Belloc S, Clement P, Menezo J, Jamal Hamidi P. and Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertility and Sterility* 2009; Vol 91, N°5.
4. Donnez J and Kim S. "Principles and Practice of Fertility Preservation". New York: Cambridge University Press 2011.
5. Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, y col. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional IVF or ICSI. *Human Reproduction* 2000; 15: 402-409.
6. Fuller B, Lane N, Benson E. "Life in the Frozen State". Hardcover: CRC Press, 1° edition 2004.
7. González Torres MA, Rawe V. Fragmentación del ADN espermático: su dinámica en el tiempo y la importancia de ir más allá de lo evidente. *Reproducción* 2010; Vol 25, N°4.
8. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessolet S, Nawroth F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction* 2004.
9. Isachenko E, Isachenko V, Katkov LL, Dessolet S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online* 2003; 6(2): 191-200.
10. Isachenko V, Isachenko E, Katkov I, Montag M, Dessolet S, Nawroth F and Van der Ven H. Cryoprotectant-Free Cryopreservation Of Human Spermatozoa By Vitrification And Freezing In Vapor: Effect On Motility, Dna Integrity, And Fertilization Ability. *Biology Of Reproduction* 2002; Vol 71.
11. Isachenko V, Isachenko E, Montag M, Zaeva V, Kriukharchenko I, Nawroth F, Dessolet S, Katkov II and Van der Ven H. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2005.
12. Isachenko E, Isachenko, V, Weiss, J M, Kreienberg R, Katkov II, Schulz M, Lulat A G, Risopatrón M J, and Sánchez R. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction* 2008; 136, 167-173.
13. Lewis S, Aitken J, Conner S, De Iulius G, Evenson D, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive BioMedicine Online* 2013; Vol 27.