

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOTECNOLOGIA



Influència de la temperatura durant el processament i anàlisi seminal humà sobre els paràmetres de qualitat espermàtica relatius a l'estat de l'ADN i la morfologia.

TREBALL FI DE MÀSTER EN BIOTECNOLOGIA BIOMÈDICA

ALUMNA: Clara Cerveró Bosch

TUTOR EXTERN: Carles Soler Vázquez

TUTORA UPV: M^a Pilar López Gresa

Curs Acadèmic: 2018/2019

VALÈNCIA, Juliol 2019

ÍNDEX

Resum	pàg. 1
<i>Abstract</i>	pàg. 2
Abreviatures	pàg. 3
1. Introducció	pàg. 4
2. Objectiu	pàg. 4
3. Materials i mètodes	pàg. 11
4. Resultats	pàg. 21
5. Discussió	pàg. 24
6. Conclusions	pàg. 32
7. Referències	pàg. 33
 Annex	

RESUM

La reproducció assistida és una pràctica mèdica de gran valor per a la societat actual ja que permet fer front als problemes de fertilitat i als distints models familiars. Existeixen diverses tècniques de reproducció assistida que s'adapten a les circumstàncies de cada cas. Totes aquestes tècniques, així com també els projectes d'investigació de l'àrea, requeriran la utilització de mostres seminals. Per tant, la qualitat de les mostres i la correcta anàlisi d'aquestes resulta fonamental. Respecte a açò, cal assenyalar que tota anàlisi seminal es realitza en unes condicions "artefactuals", ja que la fisiologia del semen ha evolucionat per a ser expressada en el context del tracte genital femení. Per aquesta raó, les mostres seminals deuen ser manipulades en aquelles condicions que garantisquen al màxim la preservació dels paràmetres de qualitat espermàtica. La temperatura és un factor que afecta a aquests paràmetres, malgrat que fins al moment no se n'ha determinat clarament l'efecte en el resultat de l'anàlisi seminal. L'objectiu del present treball fou analitzar l'efecte de la temperatura d'incubació i d'anàlisi sobre alguns paràmetres del seminograma (concentració, mobilitat, morfologia, vitalitat, condensació i maduració de la cromatina i fragmentació de l'ADN) i de la morfometria de l'espermatozoide amb l'ús d'un sistema CASA-Morph. Es van utilitzar mostres seminals de tretze donants que es van incubar a temperatura ambient i a 37 °C. Les dades obtingudes indiquen que no varen haver diferències significatives ($p > 0,05$) sobre els paràmetres de qualitat espermàtica que conformen el seminograma en funció de la temperatura d'incubació i d'anàlisi de les mostres seminals. Per la seua banda, els paràmetres morfomètrics foren significativament superiors rere incubació a temperatura ambient. Es requereix més investigació al voltant d'aquesta qüestió per poder establir quina seria la temperatura d'incubació de les mostres que maximitzaria la qualitat dels paràmetres seminals per tal de poder estandarditzar els protocols de l'anàlisi seminal.

Paraules clau: temperatura, semen, seminograma, espermatozoide, ADN, estandardització, paràmetres de qualitat espermàtica, humà, processament, morfometria.

ABSTRACT

Assisted reproduction is a valuable medical procedure in today's society since it enables us to deal with fertility problems and the different family models. There are various assisted reproduction techniques to suit the specific circumstances in each case. All of these techniques as well as the research projects in this field require the use of seminal samples. Therefore, the quality of the samples and their correct analysis are crucial. In this regard, it should be noted that all seminal analytics are carried out under 'artefactual' conditions since semen physiology has evolved to be expressed in the female genital tract context. For this reason, seminal samples should be manipulated in conditions that ensure the optimal preservation of sperm-quality parameters. Temperature is a factor which affects these parameters even though its effect on the seminal analyses results has not been determined so far. This study aims to examine the effects of incubation and analysis temperature on various sperm-quality parameters (sperm count, motility, morphology, vitality, chromatin condensation and maturation and DNA fragmentation) and the sperm morphometry using a CASA-Morph system. Seminal samples from thirteen donors were incubated at room temperature (23 °C) and at 37 °C. The data obtained show that there weren't significant differences ($p>0,05$) on the sperm quality parameters that are part of the seminogram depending on the incubation and analysis temperature of the seminal samples. On the other hand, the morphometric parameters were significantly higher after room temperature incubation. Further investigation regarding this question is needed to establish the incubation temperature that maximizes the sperm-quality parameters in order to standardize seminal analysis protocols.

Key words: Semen sample, temperature, seminogram, spermatozoa, DNA, sperm-quality parameters, human, sample processing, morphometry, standardization

ABREVIATURES

ADN: Àcid desoxiribonucleic

CASA: Sistema Automatitzat d'Anàlisi de Semen (*Computerized Assisted Sperm Analysis*)

E.E: Error estàndard

ESHRE: Societat Europea de Reproducció Humana i Embriologia (*European Society of Human Reproduction and Embriology*)

FIV: Fecundació *in vitro*

ICSI: Inyecció Intracitoplasmàtica d'Espermatozoides (*Intracytoplasmic sperm injection*)

ISAS: Sistema integrat d'anàlisi de semen (*Integrated Semen Analysis System*)

OMS: Organització Mundial de la Salut

DGP: Diagnòstic Genètic Preimplantacional

SCD: Dispersió de la Cromatina Espermàtica (*Sperm Chromatin Dispersion*)

SEF: Societat Espanyola de Fertilitat

TA: Temperatura ambient

TESA: Aspiració espermàtica testicular (*testicular sperm aspiration*)

TESE: Extracció espermàtica testicular (*testicular sperm extraction*)

TRA: Tècniques de Reproducció Assistida

1. INTRODUCCIÓ

Els problemes relatius a la fertilitat han estat motiu de preocupació al llarg de totes les civilitzacions de la història, tenint constància si més no des de l'Antic Egipte (Mendiola et al., 2005). Però és realment en els darrers anys que ens enfrontem a un vertader problema mèdic-social de salut reproductiva a nivell mundial, ja que la infertilitat és una malaltia amb alta prevalença (Uribe et al., 2017) ja que afecta a més del 15% de la població en edat reproductiva als països occidentals (1/6 parelles) i a més aquesta prevalença experimenta una evolució creixent (Sociedad Española de Fertilidad SEF, 2012). Segons el criteri establert per l'OMS (2010), la infertilitat es defineix com la impossibilitat d'una parella per a concebre un fill "naturalment" o portar a terme un embaràs després d'un any de relacions sexuals constants sense l'ús de mètodes anticonceptius. És molt difícil poder establir la causa exacta d'aquest increment en les taxes, però li és atribuït un paper crucial a la transformació de l'estil de vida. El canvi del paper de la dona en la societat amb la seua incorporació al món laboral ha generat conseqüències personals amb transcendència reproductiva com la postergació de l'establiment d'unions personals i l'embaràs. També tenen repercussió, tant en dones com en homes, els hàbits de vida poc saludables i els nivells d'estrès personals i laborals (Matorras & Hernández, 2007). Encara més els nous models de família suposen un repte reproductiu.

La medicina reproductiva és l'especialitat que aborda la reproducció humana, que ha de tindre en compte les nombroses condicions vitals que afecten a la capacitat reproductiva d'una persona al llarg de la seua vida. S'ocupa de qüestions relacionades amb la pubertat, la menopausa, l'anticoncepció, els problemes sexuals i la infertilitat. Per al tractament de possibles desordres reproductius, els especialistes disposen de diverses estratègies, tant per a l'home com per a la dona, que van des de canvis en l'hàbit sexual, aproximacions farmacològiques o quirúrgiques, fins a la reproducció assistida. Aquesta última, fa referència al conjunt de coneixements, tècniques i tractaments biomèdics destinats a facilitar o reemplaçar els processos naturals que ocorren durant la reproducció per tal d'obtindre un embaràs a terme.

Pel que respecta història de les tècniques de reproducció assistida (TRA) humana, té l'origen en 1785 amb els primers intents d'inseminació artificial per part de J. Hunter. Al llarg del temps, en l'àmbit de la reproducció ramadera es van anar produint molts avanços conduents a la criopreservació de les mostres i l'elaboració de dosis seminals, fins al punt de fer de la inseminació artificial la norma en la majoria de les espècies. No obstant, no va ser fins el 1978 quan va arribar la vertadera fita històrica en l'aplicació de les TRA en humans, amb el naixement de la primera xiqueta fruit de la fecundació in vitro i la posterior implantació embrionària per part dels doctors P. Steptoe i Robert G. Edwards (Premi Nobel de Medicina 2010) al Regne Unit. En el 1983 va nàixer a Califòrnia un xiquet concebut per donació oocitària i, a Austràlia, una dona va donar a llum un xiquet procedent d'un embrió congelat. A Espanya, el primer naixement gràcies a les TRA arribà el 1984, de la mà del grup del Dr. P. Barri en el Institut Universitari Dexeus de Barcelona. Aquests èxits donaren impuls a l'esdeveniment d'altres dos grans fets. El 1990, tingué lloc la primera aplicació clínica del diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) per part de A. Handyside, E. Kontogianni i R. Winston a Londres i el 1992 l'aparició d'una revolucionària tècnica, la microinjecció espermàtica o ICSI, desenvolupada pel Dr. G. Palermo en Brussel·les (Mendiola et al., 2005). Des d'aleshores, s'ha continuat amb una successió frenètica d'avanços que han portat al perfeccionament i aparició de noves variants tècniques.

A tall d'exemple, l'últim informe elaborat per la ESHRE (Societat Europea de Reproducció Humana i Embriologia), referit a l'any 2014 a nivell europeu, indica que es van portar a terme al voltant de 800.000 cicles de reproducció assistida que varen resultar en uns 170.000 naixements, el que ve a suposar el 2,1% del total de naixements en tota Europa (De Geyter et al., 2018). Es calcula que ara per ara hi ha més de 5 milions de xiquets nascuts fruit d'aquestes tècniques arreu del món (Rappa et al., 2016). Tot això implica que en els darrers anys, el valor d'aquestes tècniques ha cobrat pes i es consideren una peça clau en la vida de tots aquells que intenten tindre un fill i no poden aconseguir-ho de manera natural. Inicialment, la reproducció assistida estava destinada a afavorir l'embaràs front a problemes d'infertilitat, però a l'actualitat, també es un recurs important per a persones que afronten la maternitat individualment o per a parelles homosexuals, així com també amb fins terapèutics amb el naixement de xiquets

compatibles amb els seus germans o per evitar la transmissió de certes malalties genètiques.

Cal destacar que Espanya es situa al front dels països europeus en l'aplicació de les TRA, per davant de Rússia i França, amb major nombre de tractaments realitzats segons la ESHRE (De Geyter et al., 2018). Compta amb unes xifres de 180.000 tractaments al any i existeixen 307 centres especialitzats, tant públics com privats, que la situen com un referent de l'àrea a nivell mundial, segons les últimes dades del registre d'activitat de la SEF («Registro Nacional de Actividad 2016», 2018).

Quedant patent la rellevància econòmica i social de la reproducció assistida, per tal d'endinsar-nos en la qüestió d'aquest treball, és necessari presentar el factor masculí. És l'andrologia l'especialitat mèdica que es centra en l'estudi del factor masculí, sent l'anàlisi de la qualitat espermàtica la clau d'entrada a l'estudi del baró. Així doncs, en els darrers anys, l'estudi de la fertilitat va començar a mirar seriosament cap a l'home, concretament, al seu semen, ja que s'estima que en un 50% dels casos intervé el factor masculí (Rappa et al., 2016; Pourmasumi et al., 2019). A més, estudis recents han revelat que la qualitat del semen dels homes d'occident, és pitjor que fa 40 anys (Levine et al., 2017). Aquestes dades estan en sintonia amb les obtingudes per una investigació d'una cohort de 120.000 individus que presenta que un 21,3% dels homes necessiten de tractaments de fertilitat per a ser pares (9% més que una dècada enrere) (Tiegs et al., 2018). Amb aquestes dades, una vegada més, es posa de manifest la rellevància de les TRA hui dia.

Tant per a la valoració de la fertilitat o en l'aplicació de les TRA, així com també per al desenvolupament dels projectes d'investigació de l'àrea de l'Andrologia, els espermatozoides s'han de processar prèviament al seu estudi. Per tant, va a ser fonamental tant l'anàlisi com el propi maneig de la mostra masculina, que sol obtenir-se a partir de l'ejaculat, obtingut per masturbació, encara que es podria obtenir també a través d'una biòpsia o aspiració testicular (TESE y TESA respectivament) (Hosseini & Khalili, 2017). El semen o esperma és un líquid viscos i blanquinós emès en el moment de l'ejaculació, resultat de la conjunció de les secrecions de les glàndules genitals del

sexe masculí. Està compost per una suspensió d'espermatozoides en els fluids produïts pels òrgans sexuals masculins accessoris, vesícula seminal i pròstata majoritàriament (OMS, 2010).

L'avaluació de la mostra seminal, i conseqüentment dels espermatozoides, es porta a terme a través de la realització d'un seminograma o espermograma. Es tracta d'una prova bàsica que analitza qualitativament i/o quantitativa la mostra valorant diversos paràmetres tant macroscòpics (volum, pH, color, olor, liqüefacció i viscositat) com microscòpics (concentració, mobilitat, vitalitat, morfologia, estat de l'ADN, ...). Els valors obtinguts es comparen amb els criteris de normalitat que proporciona l'OMS (OMS, 2010) [Detallats a l'annex] amb la finalitat d'oferir un diagnòstic i també per a poder elegir, si és el cas, el tractament més adient per a cada pacient. Els test de funcionalitat espermàtica (Pandiyan et al., 2017), poden proporcionar en alguns casos, una indicació addicional valuosa de la qualitat de l'esperma (Thijssen et al., 2014) i que pot prendre importància sobre l'èxit reproductiu.

S'ha de remarcar que entre les proves que constitueixen el seminograma, podem diferenciar aquelles que proporcionen unes mesures subjectives dels paràmetres i aquelles que en proporcionen d'objectives. Les primeres s'obtenen a partir d'estimacions subjectives basades en la destresa visual de l'analista i en alguns casos poden estar limitades per una falta de precisió, repetibilitat i exactitud (Yániz et al., 2018). Per solucionar aquestes limitacions, a finals dels anys 70 es va introduir una tecnologia d'anàlisi espermàtic automatitzada, coneguda genèricament com a sistemes CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*). Aquests sistemes es consideren un mètode senzill i objectiu per a obtenir paràmetres seminals diversos i ben definits així com també informació addicional d'altres variables (Matorras & Hernández, 2007; Saravia et al., 2007; Yániz et al., 2018). La concentració, mobilitat, morfologia i vitalitat són algunes de les proves que es poden portar a terme amb aquest sistema. Per això, recentment s'ha proposat una nomenclatura que especifique i clarifiqui el sistema utilitzat (CASA-Morph, CASA-Mot...) (Soler et al., 2016; Holt et al., 2018)

Cal assenyalar que tota analítica seminal es realitza en unes condicions “artefactuals”, ja que la fisiologia del semen ha evolucionat per a ser expressada en el context del tracte genital femení. Per tant, les condicions en les que es processa la mostra i es realitza l’anàlisi d’aquesta van a afectar, d’alguna manera, els paràmetres de qualitat espermàtica. Hi ha diversos factors que afecten la qualitat de la mostra seminal, uns són de caire biològic (estat del donant, temps d’abstinència...) i d’altres relatius al processament en el laboratori com ara, les tècniques de preparació de la mostra, l’interval de temps (incubació) i la temperatura (Thijssen et al., 2014; Hosseini & Khalili, 2017).

Centrant-nos en aquest últim aspecte, és interessant destacar que la temperatura dels testicles i els epidídimis és dos o tres graus centígrades més baixa que la temperatura corporal per tal de produir i mantenir uns espermatozoides viables (Thijssen et al., 2014). Durant l’ejaculació, en barrejar-se amb els fluids de les glàndules accessòries, aquesta temperatura augmenta fins a la corresponent al tracte genital femení, al voltant dels 35 °C. Aquesta sensibilitat als canvis de temperatura reforça la idea de la necessitat de tindre en compte aquest factor per la seua possible influència sobre la qualitat de la mostra seminal. Fins al moment, existeixen resultats contradictoris sobre els efectes perjudicials de la incubació i maneig de la mostra seminal a temperatura corporal (37 °C), però malgrat açò, encara és habitual a la majoria de laboratoris de FIV mantenir les mostres a aquesta temperatura abans de la seua utilització en TRA (Thijssen et al., 2014).

És evident que les mostres seminals deuen ser manipulades en aquelles condicions que garanteixen al màxim la preservació dels paràmetres de qualitat espermàtica. I per aquest motiu, resulta important avaluar com poden afectar les condicions en les que es realitza l’anàlisi (Dashti et al., 2018). L’OMS ha publicat al llarg del temps diversos manuals de laboratori per a l’anàlisi i processament del semen humà. En les diferents edicions els criteris de maneig i processament, així com de l’avaluació del semen han estat més i més estrictes. L’última edició és del 2010 i recull certes millores en les directrius a seguir (OMS, 2010). No obstant, hi ha alguns aspectes que encara no s’han determinat. Aquests manuals tenen l’objectiu de estandarditzar el procés i per tant

millorar la qualitat de l'espermograma, permetent així la comparació de resultats tant en la clínica com en la investigació (Apell & Evans, 1977; Cooper et al., 2010; OMS, 2010).

Centrant-nos en l'espermatozoide, val a dir que és la cèl·lula haploide que constitueix la gàmeta masculina i contribuirà a la formació de l'embrió després de la fusió amb la gàmeta femenina, l'oòcit. Està format principalment pel cap, que conté tota la informació genètica i una cua que li permet el moviment. [La morfo-fisiologia de l'espermatozoide es troba més detallada a l'Annex]. Els espermatozoides són un tipus de cèl·lula especialitzada amb unes característiques singulars entre la resta de les cèl·lules de l'organisme. Des de la seua formació al testicle experimenten una sèrie de canvis morfològics i funcionals al seu pas per l'epidídim (Hosseini & Khalili, 2017). Com ja hem assenyalat abans, el contacte amb les secrecions de les glàndules accessòries també és un moment de canvis, que encara són més acusats quan es troben en les criptes vaginals després de ser ejaculats (Rappa et al., 2016).

Uns vegada dipositat el semen en la vagina, els espermatozoides van a realitzar un viatge ple d'obstacles fins a les proximitats de l'oòcit que impliquen una varietat de modificacions, des de la capacitació inicial fins a la hiperactivació i la reacció acrosòmiques prèvies a la penetració en l'oòcit [per una informació detallada de tot el procés de formació i maduració veure l'annex]. Per tant podem dir que l'espermatozoide és una cèl·lula molt diferenciada amb uns canvis genètics, cel·lulars, funcionals molt marcats, tots els quals tenen una implicació directa sobre la fertilitat i el desenvolupament embrionari. Un dels aspectes cabdals que té lloc des de la meiosi fins als processos que tenen lloc en les proximitats de l'oòcit fan referència a la càrrega genètica que transporta cada espermatozoide. Cal remarcar que el dany potencial al ADN és multifactorial i pot ser degut tant a factors intratesticulars com extra (Zini & Libman, 2006) i també pot ocórrer a distints nivells [L'annex recull informació dels nivells de dany de l'ADN].

Com siga que la reproducció és, en últim terme, la transmissió de càrregues gèniques dels dos progenitors, la integritat del genoma patern, igual com del matern, és determinant a l'inici i manteniment d'un embaràs (Álvarez, 2006; Simonenko et al.,

2016). S'ha demostrat que espermatozoides amb l'ADN danyat poden fecundar els oòcits madurs amb la mateixa eficàcia que aquells amb l'ADN intacte, no obstant, si aquests danys no aconsegueixen ser reparats per la maquinària de l'oòcit, van a resultar incompatibles amb un desenvolupament embrionari i fetal normals (Álvarez, 2006). Així que, la fecundació per espermatozoides danyats podrà desembocar en alteracions en el desenvolupament de l'embrió, errors en la implantació o augment en les taxes d'avortament (Álvarez, 2006; Thijssen et al., 2014; Lusignan et al., 2018). De fet, els problemes relacionats amb la fragmentació de l'ADN es van observar en casos d'avortament recurrent deguts a factor masculí (Álvarez, 2006; Oumaima et al., 2018). A més, existeix evidència clínica de que els espermatozoides d'homes infèrtils presenten un dany substancialment major a l'ADN que els d'homes fèrtils (Zini & Libman, 2006).

L'anàlisi seminal clàssic no ha inclòs l'estudi de les característiques de l'ADN espermàtic, per això alguns autors venen considerant introduir nous mètodes d'avaluació de la mostra seminal. Actualment, es disposen de diverses tècniques que analitzen aspectes relacionats en la integritat de l'ADN i la cromatina espermàtica (Lusignan et al., 2018). [A l'Annex es recull informació més detallada sobre les bases de les tècniques utilitzades]. Com ja s'ha mencionat prèviament, els danys a nivell de l'ADN i la cromatina dels espermatozoides tenen conseqüències sobre l'èxit reproductiu. A més, l'estudi del dany a l'ADN espermàtic és rellevant en una era en la qual s'utilitzen freqüentment TRA avançades amb les que es salten les barreres naturals de selecció (Zini & Libman, 2006; Rappa et al., 2016). Aquests fets evidencien la necessitat de mantenir la qualitat no sols dels paràmetres bàsics sinó també de l'ADN espermàtic, per la qual cosa resulta necessari valorar les condicions òptimes en el processament de les mostres per tal de obtenir unes valoracions representatives a l'estat de la mostra i poder fer un diagnòstic adequat de la fertilitat del baró, a més, en última instància, també interessa no comprometre l'estat de l'ADN dels espermatozoides degut a una mala pràctica en el maneig i l'anàlisi de la mostra.

Per altra banda, com siga que el contingut del nucli de l'espermatozoide condiciona o pot condicionar la forma general del cap, s'han desenvolupat diversos treballs que intenten relacionar ambdós aspectes de l'espermatozoide (Saravia et al., 2007; Nava-

Trujillo et al., 2012; Oumaima et al., 2018). A més també hi ha evidències de que un percentatge elevat d'espermatozoides amb anomalies morfològiques afecten a la fertilitat per estar relacionades amb l'estat de la cromatina (Saravia et al., 2007; Rappa et al., 2016; Oumaima et al., 2018). Per aquesta raó, també resulta convenient considerar aquest paràmetre a l'hora de determinar les condicions òptimes per al seminograma.

2. OBJECTIU

L'objectiu principal d'aquest treball va ser estudiar l'efecte de la temperatura d'incubació i d'anàlisi de la mostra seminal (temperatura ambient i 37 °C) sobre els paràmetres de qualitat espermàtica i més concretament de la morfometria del cap i l'estat del DNA espermàtic. Cal esmentar que el present treball forma part d'un objectiu més ampli que pretén definir l'estandardització òptima del processament i anàlisi seminal humà.

3. MATERIALS I MÉTODES

Recol·lecció i preparació de les mostres seminals

L'estudi es va realitzar utilitzant mostres seminals d'una cohort de donants voluntaris formada per 13 homes adults ($\bar{X}=25'85$, $\sigma=8'75$, 19-53 anys d'edat). Prèviament a l'obtenció de les mostres, els participants van signar el consentiment informat corresponent [adjunt a l'annex]. Les mostres es varen recol·lectar per masturbació en recipients estèrils, que contenien quimiotripsina, després d'un període d'abstinència ejaculatòria de 2-5 dies. Les mostres s'identificaven mitjançant un codi anònim garantint la confidencialitat de les dades d'acord amb allò establert en la Llei Orgànica 15/99 de 13 de desembre de protecció de dades de caràcter personal (LOPD). Val a dir que el laboratori on s'ha realitzat compta amb una acreditació ISO 9001-2015. La líquuefacció de les mostres, facilitada per la presència de la quimiotripsina, es va portar a terme durant un període inicial de 15 minuts a una estufa a 37 °C. Posteriorment, la mostra es va homogeneïtzar suaument, es va determinar el volum utilitzant una pipeta graduada

i es va dividir en dues alíquotes (Figura 1). Durant aquest procés les mostres es van protegir de la llum.

Disseny experimental

Cadascuna de les anteriors es va sotmetre a una condició experimental, 37 °C o temperatura ambient (TA) que va ser de 23 °C ± 1 °C, durant 15 min addicionals per a completar el procés de líquefacció. Passat aquest temps es va procedir a la valoració de la concentració espermàtica, diluint quan va ser oportú (veure més endavant). Així doncs, el temps total entre l'inici de la incubació i la realització dels frotis pertinents va ser al voltant de 60 minuts.

De cada mostra de semen es van fer frotis amb 10 µL que es van deixar assecar a l'aire per a la seua posterior tinció en funció de la variable a estudiar. Es van utilitzar dues preparacions per a cadascuna de les proves, conservant-se dues més de reserva per si hi havia algun problema (ruptura portaobjectes o tinció defectuosa).

Anàlisi seminal

- Determinació de la concentració i anàlisi de la mobilitat

Les anàlisis es varen fer utilitzant el sistema ISAS[®] v1 CASA-Mot (Proiser R+D S.L., Paterna, Valencia, Spain), equipat amb una càmera de vídeo ISAS[®] CM13-ON connectada a un microscopi UB203 (UOP/Proiser), utilitzant un objectiu de contrast de fase negativa 10x (apertura numèrica (N.A) 0,25) i un filtre de color verd al condensador. En el cas de la mostra a 37 °C es va utilitzar el sistema integrat de calfament per a mantenir la temperatura de la platina microscòpica a 37 °C durant l'anàlisi. La resolució final de les imatges va ser de 1280 x 1024 píxels.

Es va determinar la concentració i la mobilitat de la mostra utilitzant una càmera de recompte reutilitzable de 10 µm Spermtrack[®] (Proiser) sobre la qual es van dipositar 2,5 µL de mostra i es van fer nou captures d'1 segon (a 50 imatges/segon) per distints camps de la càmera de recompte (Figura 2). En el cas de la mostra a temperatura 37 °C,

prèviament, la càmera de recompte, es va mantenir 30 minuts, aproximadament, sobre una placa calefactada (Proiser) a 37 °C.

Quan la concentració va ser superior a 30×10^6 cèl./mL es va diluir fins a la mateixa amb medi de llavat FertiCult TM (FertiPro N.V., Beernem - Bèlgica) i es va utilitzar la nova preparació per a realitzar l'anàlisi seminal. Abans de mesclar-se amb la mostra, el medi havia de trobar-se a la mateixa temperatura que aquesta, 37 °C o TA, per tant, es va mantenir a l'estufa a 37 °C quan era necessari.

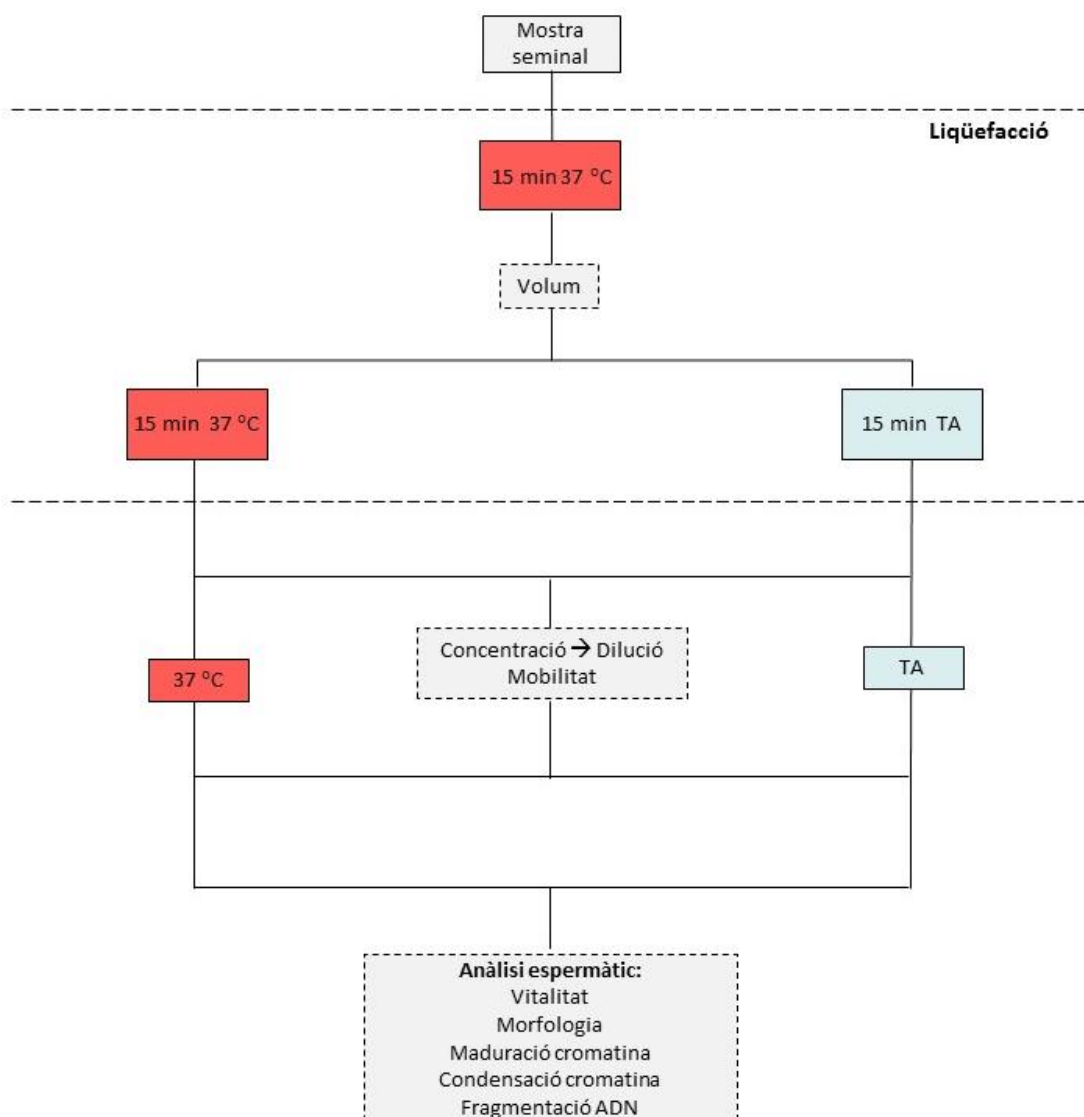


Figura 1. Disseny experimental. TA=temperatura ambient (23 °C)

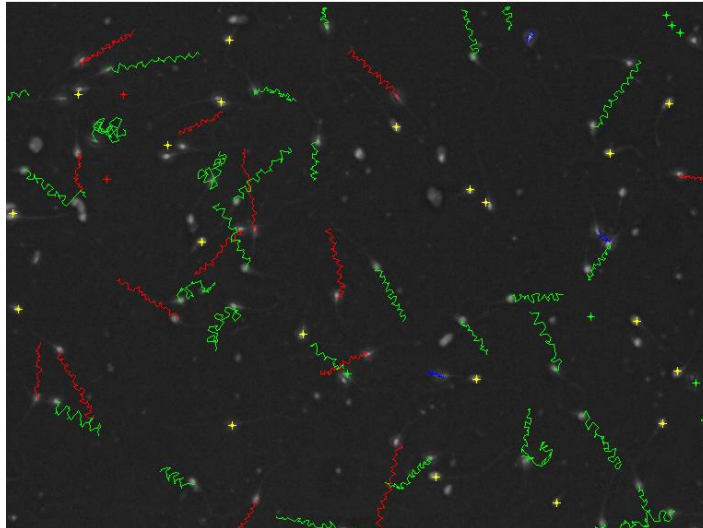


Figura 2. Imatge obtinguda amb el sistema ISAS® v1 CASA-Mot amb un objectiu de contrast de fase negativa 10x. S'observen marcadres de distintes colors les trajectòries dels espermatòzoides: roig, tipus a (progressius ràpids); verd, tipus b (progressius lents); blau, tipus c (no progressius) i groc, tipus d (estàtics).

- *Anàlisi de vitalitat espermàtica*

La vitalitat es defineix considerant la permeabilitat de la membrana plasmàtica del cap de l'espermatozoide. L'avaluació es va realitzar utilitzant la tècnica de tinció eosina/nigrosina, la qual està basada en el fet que aquells espermatòzoides que presenten perforacions (no vius) en la seua membrana són permeables a la eosina i es mostren de color rosa. En canvi, aquells espermatòzoides amb la membrana intacta (vius) romanen sense tenyir ja que l'eosina no pot entrar (Figura 3).

Es varen mesclar 10 µL de mostra, 20 µL d'eosina (Merck KGaA., Darmstadt, Alemanya) i 10 µL de nigrosina (Merck KGaA.). Es varen dipositar sobre un portaobjectes 10 µL de la mescla i es va realitzar el frotis. Es varen deixar assecar a l'aire. Les preparacions, es van muntar amb immersió d'1 segon en la solució Neo-Clear® (Merck KGaA.) i seguidament es van aplicar gotes de medi de muntatge Neo-Mount® (Merck KGaA.) i es van cobrir amb un cobreobjectes (24mm x 60 mm).

Les anàlisis es varen portar a terme de forma subjectiva a partir d'imatges obtingudes amb el mòdul de captura del sistema ISAS®v1 (Proiser). La càmera utilitzada va ser una

ISAS® CM13-ON connectada a un microscopi UB203 (UOP/Proiser) utilitzant l'objectiu de camp clar 20x amb una resolució final de 0,240337 µm/píxel en ambdós eixos. Es van capturar i analitzar imatges si més no 200 espermatozoides de cada mostra. Els resultats es van expressar com a percentatges.

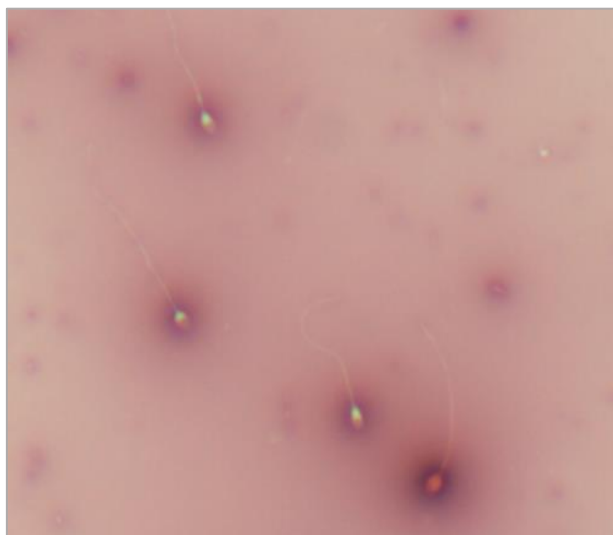


Figura 3. Imatge d'una preparació teñida amb la tècnica eosina/nigrosina obtinguda amb l'objectiu de camp clar 20x. Els espermatozoides amb el cap blanquinós (no teñits) tenen la membrana intacta i es consideren vius. Els espermatozoides amb el cap roig-rosa (teñits) tenen la membrana foradada i es consideren com a morts.

- *Morfometria*

L'anàlisi de la morfometria clàssica de l'espermatozoide es va realitzar mitjançant la tinció Panòptic Ràpid (derivada de la tècnica de Papanicolau), utilitzant el kit Diff-Quick (Medion Diagnostics, Düringen, Suïssa).

Les preparacions es van mantenir durant 1 minut en cadascuna de les tres solucions (fixador, tiny1, tiny2), es va llavar l'excés de colorant amb aigua destil·lada i es varen assecar a l'aire. Les preparacions es van muntar realitzant el procediment descrit a l'anàlisi de la vitalitat.

Les anàlisis es van portar a terme utilitzant el mòdul de morfometria del sistema ISAS®v1 CASA-Morph (Proiser). La càmera utilitzada va ser una ISAS® CM13-ON connectada a un

microscopi UB203 (UOP/Proiser) utilitzant l'objectiu de camp clar 40x, amb una resolució de 0,121526 μm /píxels en ambdós eixos. Es van capturar i analitzar imatges corresponents a un mínim de 200 espermatozoides de cada mostra (Figura 4B). De cada imatge es van obtenir 13 valors morfomètrics: longitud (L, μm), amplària (W, μm), àrea (A, μm^2), perímetre (P, μm), acrosoma (% àrea del cap) i els factors de forma el·lipticitat ($((L-W)/(L+W))$), rugositat ($4\pi A/P^2$), elongació (L/P), regularitat ($\pi LW/4A$); i quatre de la peça intermèdia: amplària (μm), àrea (μm^2) distància d'intersecció (μm) i angle d'inserció ($^\circ$) (Figura 4A).

- *Anàlisi de maduració de la cromatina*

L'anàlisi es va realitzar mitjançant la tinció blau d'anilina. Les preparacions es van fixar amb formaldehid 4% (p/v) (Probus, S.A., Badalona, Spain) durant 5 minuts, es van rentar amb aigua destil·lada i es van teyir durant 5 minuts amb colorant blau d'anilina 5% (p/v) (Merck KGaA.). Es van llavar amb aigua destil·lada i es van assecar a l'aire. Les preparacions es van muntar realitzant el procediment descrit a l'anàlisi de la vitalitat.

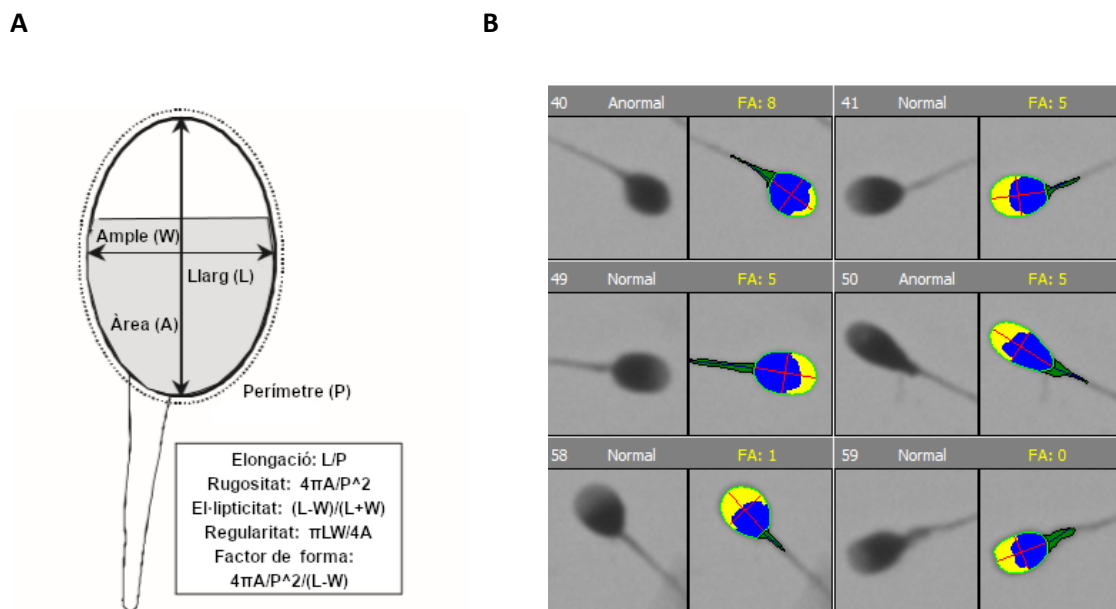


Figura 4. A. Esquema d'un espermatozoide amb els paràmetres de morfometria. **B.** Imatge obtinguda amb objectiu de camp clar 40x, amb el sistema ISAS[®]v1 CASA-Morph on s'observen distints espermatozoides (dreta) amb el seu anàlisi corresponent (esquerra). Preparació tenyida amb Panòptic ràpid (kit Diff-Quick). El sistema identifica les parts de l'espermatozoide: acrosoma (groc), zona post-acrosòmica (blau) i peça mitjana (verd).

Les anàlisis es van portar a terme utilitzant un sistema de captura d'imatges amb l'equipament i les condicions relatives a l'estudi morfomètric. Es van capturar i analitzar imatges de 200 espermatozoides, si més no, de cada mostra. Es va discriminar subjectivament entre aquells espermatozoides incoloros (madurs) i aquells que es troben total o parcialment tenyits (immadurs). Els resultats es van expressar com a percentatges (Figura 5). Els resultats es van expressar com a percentatges.



Figura 5. Imatge d'una preparació tenyida amb la tècnica blau d'anilina obtinguda amb un microscopi amb l'objectiu de camp clar 40x. Els espermatozoides amb el cap blau clar (no tenyits) es considera que tenen la cromatina madura. Els espermatozoides amb el cap blau obscur (tenyits) es considera que tenen la cromatina immadura.

- *Anàlisi de la condensació de la cromatina*

L'anàlisi es va realitzar mitjançant la tinció blau de toluidina utilitzant el Kit Sperm Chromatin Maturation Assay (SCMA kit, Avicenna Research Institute, Evin, Teheran-Iran). Les preparacions es van posar a la solució A durant 30 minuts a 4 °C aproximadament al refrigerador. Després es van introduir a la solució B durant 7 minuts a temperatura ambient, posteriorment es van llavar acuradament amb aigua desionitzada i es van introduir a la solució C durant 3 minuts a temperatura ambient. Les mostres es van llavar indirectament amb aigua desionitzada per tal d'eliminar la solució,

després es van assecar a l'aire i es van muntar realitzant el procediment descrit a l'anàlisi de la vitalitat.

Les anàlisis es van portar a terme utilitzant un sistema de captura d'imatges amb l'equipament i les condicions relatives a l'estudi morfomètric. Es van capturar i analitzar imatges de 200 espermatozoides, si més no, de cada mostra. Es va discriminar subjectivament entre aquells espermatozoides que presentaven coloració roja-morada (poc condensats) i aquells que presentaven coloració blavosa (condensats) (Figura 6). Els resultats es van expressar com a percentatges.

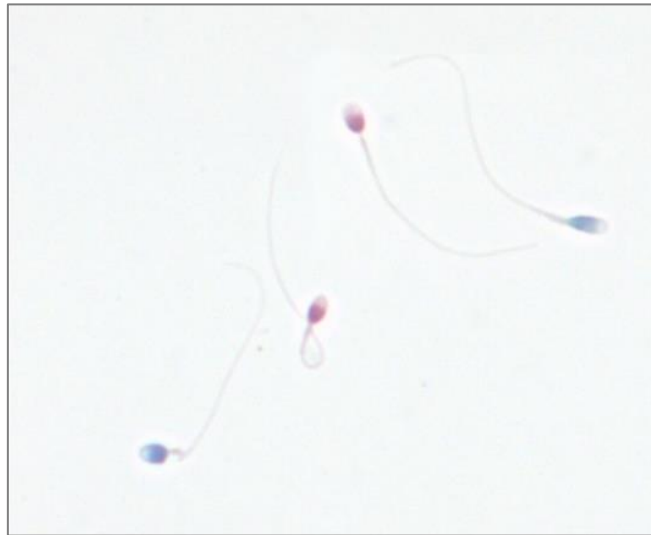


Figura 6. Imatge d'una preparació teñida amb la tècnica de blau de toluidina obtinguda amb un microscopi amb l'objectiu de camp clar 40x. Els espermatozoides amb el cap blavós es considera que tenen la cromatina condensada. Els espermatozoides amb el cap amb coloració roja-morada es considera que tenen la cromatina condensada incorrectament.

- *Valoració de la Fragmentació ADN*

La valoració del nivell de fragmentació de l'ADN del cap de l'espermatozoide es va portar a terme utilitzant el kit comercial Halosperm® G2 test (Halotech DNA, S.L., Madrid, Espanya) que segueix el principi de dispersió de cromatina espermàtica (SCD) (Fernández et al., 2003).

Una alíquota de 100 µl de gel d'agarosa es va incubar en un tub eppendorf a 90-100 °C durant 5 minuts i després durant 5 minuts més a 37 °C en un bany d'aigua. Posteriorment es van afegir 50 µL de la mostra seminal al tub i es va mesclar suaument. Una alíquota de 8 µL de la mostra es va posar al portaobjectes (*super-coated*) proporcionat pel kit sobre una superfície freda i es va cobrir amb un cobreobjectes de 24x24mm. Els portaobjectes es van mantenir durant 5 minuts al refrigerador a 4 °C per a crear un microgel amb els espermatozoides. Els cobreobjectes es van retirar acuradament. Posteriorment, es va cobrir la preparació amb la solució 1 (Agent desnaturalitzant) i es va incubar per 7 minuts, després es va retirar i aplicar la solució 2 (solució de lisi) i es va incubar per 20 minuts. El portaobjectes es va llavar amb aigua destil·lada durant 5 minuts i es va deshidratar durant 2 minuts amb etanol 70 % (v/v) seguidament de 2 minuts amb etanol 100% (v/v).

Després es van deixar assecar i posteriorment els portaobjectes es van tenyir mantenint-los en una posició horitzontal amb la solució 3 (solució de tinció A) durant 7 minuts. El colorant es va eliminar amb inclinacions successives fins que es va assecar completament. Es va aplicar la solució 4 (solució de tinció B) durant 7 minuts. L'excés de colorant es va eliminar com anteriorment i es va deixar assecar a temperatura ambient. Per últim, les preparacions es van muntar realitzant el procediment descrit a l'anàlisi de la vitalitat.

Les anàlisis es van portar a terme utilitzant un sistema de captura d'imatges amb l'equipament relatiu a l'estudi morfomètric i utilitzant un objectiu de camp clar 40x o 20x, amb una resolució final de 0.121526 µm/píxels i 0.488568 µm/píxel en ambdós eixos respectivament. Es van capturar i analitzar imatges de 200 espermatozoides, si més no, de cada mostra. Es va discriminar subjectivament, seguint el criteri indicat en el kit, entre aquells espermatozoides que presentaven un halo gran-mitjà (no fragmentats) i aquells que no presentaven halo (fragmentats) (Figura 7). Els resultats es van expressar com a percentatges.

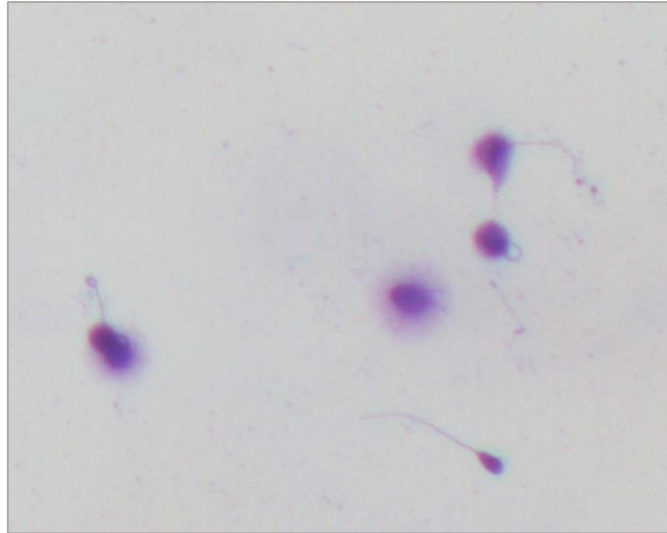


Figura 7. Imatge d'una preparació tenyida amb la tècnica SCD obtinguda amb un microscopi amb l'objectiu de camp clar 40x. Els espermatozoides amb un halo al voltant del es considera que tenen l'ADN no fragmentat. Els espermatozoides amb el cap sense halo es considera que tenen l'ADN fragmentat.

Anàlisi estadística

S'utilitzaren proves de normalitat i homocedasticitat utilitzant Shapiro-Wilk y proves de Kolmogorov-Smirnov, respectivament, a les dades obtingudes de les anàlisis dels paràmetres del seminograma i paràmetres morfomètrics. Per a la comparació de les temperatures d'incubació i anàlisi es va utilitzar un model mixt. En les anàlisis, la variància per a cadascun dels mètodes es va estimar per separat.

El model estadístic utilitzat va ser del tipus:

$$Y_{ijk} = \mu + I_i + A_j + (IA)_{ij} + \varepsilon_{(ij)k}$$

On,

Y_{ijk} = k-èsima observació corresponent al i-èsim factor I, del j-èsim factor A, (observació= 1, 2, ..., o).

μ = mitjana general.

I_i = efecte del nivell i-èsim del factor I (temperatura d' incubació; $i = 1, 2$).

A_j = efecte del nivell j-èsim del factor A (temperatura d'anàlisi; $j = 1, 2$).

$(IA)_{ij}$ = efecte produït per la interacció I*A.

$\varepsilon_{(ij)k}$ = error experimental. Es suposen variables aleatòries independents $N(0, \sigma)$.

Es varen realitzar proves de comparació múltiple pel mètode de mínims quadrats i es v autilitzar la correcció de Bonferroni, amb un nivel de significació estadística de 0,05. Les anàlisis estadístiques es varen realitzar utilitzant el software Statgraphics Centurion XVII, 17.2.04. (32-bit) (1982-2016 por Statpoint Technologies, Inc., EE. UU.). Els resultats es presenten com la mitjana \pm l'error estàndard (E.E).

4. RESULTATS

Efecte de la temperatura sobre els paràmetres del seminograma

No es trobaren diferències significatives per a cap dels paràmetres avaluats, tant de forma subjectiva com mitjançant els sistemes CASA-Mot i CASA-Morph, en l'elaboració del seminograma (Taula 1) després de la incubació temperatura ambient o a 37 °C. Les dades es troben expressades com la mitjana \pm E.E. Malgrat no haver diferència significativa entre les dues condicions els paràmetres relatius a l'estat de l'ADN i de la cromatina varen ser lleugerament superiors a TA que a 37 °C.

Paràmetres seminals	Temperatura ambient	37 °C
Concentració total (10 ⁶)	657,82 \pm 201,28	658,89 \pm 201,16
Mobilitat progressiva (% a + b)	42,86 \pm 5,07	45,19 \pm 5,48
Mobilitat no progressiva (% c)	6,87 \pm 0,74	4,05 \pm 0,28
Vitalitat espermàtica (% vius)	59,67 \pm 3,44	58,01 \pm 4,05
Morfologia (% normals)	29,69 \pm 3,56	27,60 \pm 4,18
Maduració de la cromatina espermàtica (% madurs)	63,71 \pm 4,21	65,42 \pm 3,70
Condensació de la cromatina espermàtica (% condensats)	85,83 \pm 2,55	81,68 \pm 2,82
Fragmentació d'ADN espermàtic (% no fragmentats)	84,51 \pm 4,30	83,52 \pm 3,44

Taula 1. Paràmetres de qualitat espermàtica del seminograma després de la incubació de les mostres a TA i a 37 °C. Les dades indiquen la mitjana \pm error estàndard (n=13). No es trobaren diferències significatives (P>0,05). La temperatura ambient (TA) es correspon a 23 \pm 1°C.

Efecte de la temperatura sobre la morfometria de l'espermatozoide

Es varen analitzar un total de 2645 espermatozoides de mostres incubades a temperatura ambient i 2613 espermatozoides de mostres a 37 °

La comparació dels paràmetres morfomètrics relatius al cap de l'espermatozoide incubats a les dues temperatures diferents (TA i 37 °C), Figura 8, mostra diferència altament significativa ($p < 0.05$) per a tots els paràmetres. Per a la longitud $5,07 \pm 0,01$ μm a TA front a $5,01 \pm 0,01$ μm a 37 °C; el valor de l'amplada va disminuir de $3,17 \pm 0,01$ μm a TA fins a $3 \pm 0,01$ μm a 37 °C; l'àrea a TA va ser de $13,28 \pm 0,05$ μm^2 i a 37 °C $12,23 \pm 0,04$ μm^2 i el perímetre $14,1 \pm 0,03$ μm a TA mentre que va ser $13,67 \pm 0,03$ μm a 37 °C. En quant a l'el·lipticitat va ser $1,62 \pm 0,01$ a TA i $1,69 \pm 0,01$ a 37 °C; la rugositat va ser $0,84 \pm 1,20 \cdot 10^{-3}$ a TA i $0,82 \pm 1,40 \cdot 10^{-3}$ a 37 °C; l'elongació va ser $0,23 \pm 1,50 \cdot 10^{-3}$ a TA i $0,25 \pm 1,60 \cdot 10^{-3}$ a 37 °C i la regularitat $0,95 \pm 8,20 \cdot 10^{-4}$ a TA i $0,96 \pm 9,50 \cdot 10^{-4}$ a 37 °C. Per últim l'acrosoma va disminuir de $37,36 \pm 0,19$ % a TA a $35,84 \pm 0,19$ % a 37 °C. A temperatura ambient tots els paràmetres morfomètrics són majors que a 37 °C, mentre que els paràmetres de forma són menors, excepte la rugositat.

Per altra banda, els paràmetres morfomètrics corresponents a la peça mitjana de l'espermatozoide, Figura 9, també mostra diferència altament significativa ($p > 0.05$) per a tots els paràmetre excepte per a l'angle d'intersecció de la peça mitjana (Figura 8D). Els paràmetres varen ser: amplada $1,46 \pm 0,01$ μm a TA i $1,31 \pm 0,01$ μm a 37 °C, àrea $2,36 \pm 0,02$ μm a TA i $2,07 \pm 0,02$ μm a 37 °C, distància d'intersecció $0,20 \pm 3,5 \cdot 10^{-3}$ μm a TA i $0,18 \pm 2,8 \cdot 10^{-3}$ μm a 37 °C i angle d'intersecció $8,68 \pm 0,19$ ° a TA respecte a $8,15 \pm 0,19$ ° a 37 °C. En aquest cas, a temperatura ambient tots els paràmetres morfomètrics són majors que a 37 °C.

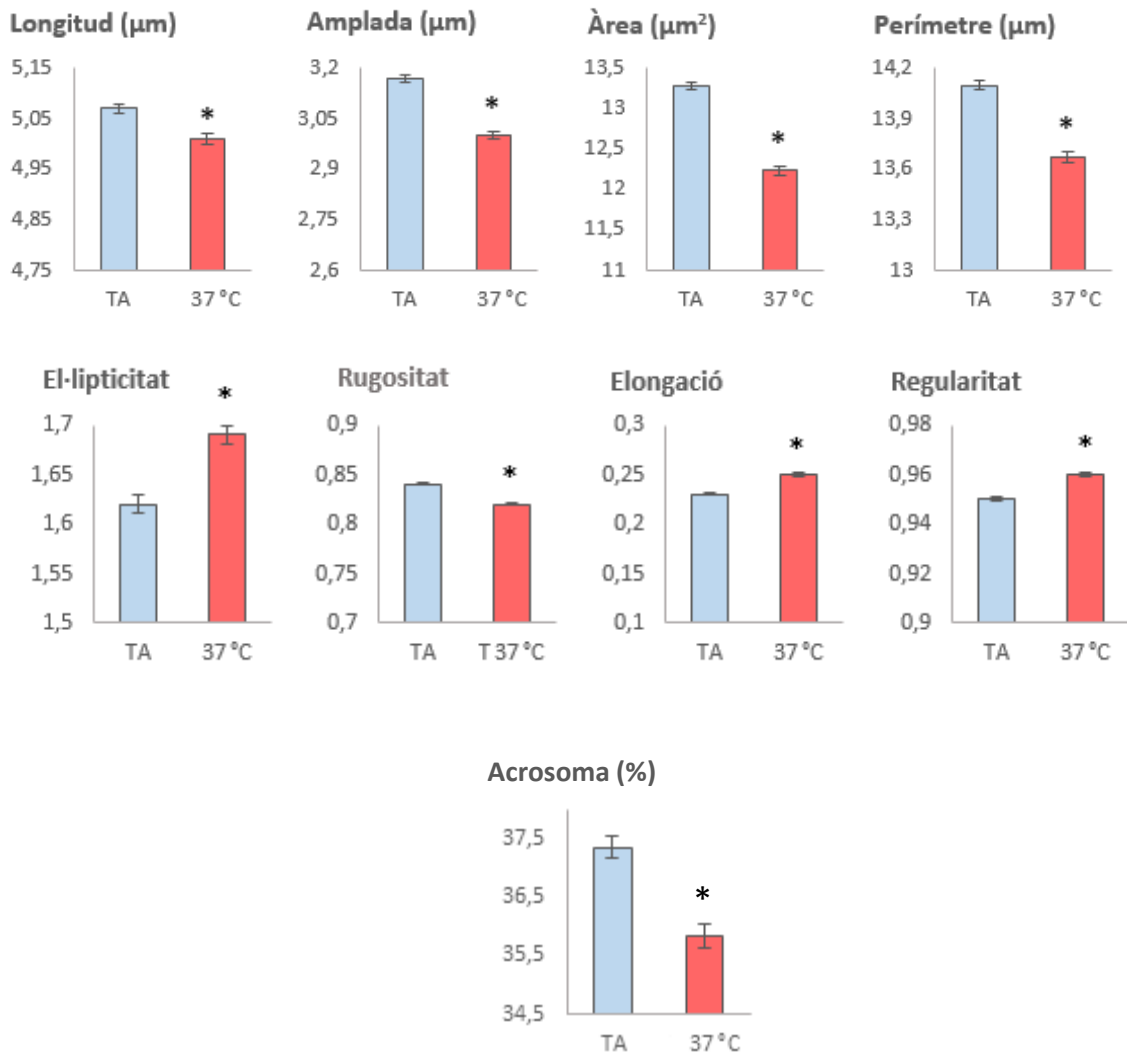


Figura 8. Paràmetres morfomètrics corresponents al cap de l'espermatozoide i l'acrosoma ($\bar{X} \pm E.E.$). * $p < 0,05$ entre temperatures. Es varen analitzar 2645 espermatozoides de mostres incubades a temperatura ambient i 2613 espermatozoides a 37 °C. TA= temperatura ambient, 23 ± 1 °C.

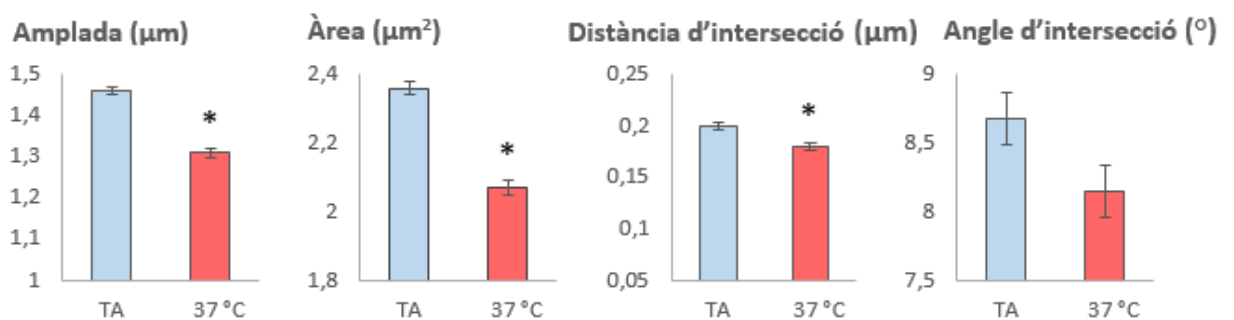


Figura 9. Paràmetres morfomètrics corresponents a la peça mitjana de l'espermatozoide ($\bar{X} \pm E.E.$). * $p < 0,05$ entre temperatures. Es varen analitzar 2645 espermatozoides de mostres incubades a temperatura ambient i 2613 espermatozoides a 37 °C. TA= temperatura ambient, 23 ± 1 °C.

5. DISCUSSIÓ

Malgrat ser conscients que la temperatura és un factor que influeix sobre la qualitat de la mostra seminal, als laboratoris d'andrologia no hi ha un criteri estandarditzat respecte la temperatura d'incubació de les mostres abans i durant la realització del seminograma, tenint cada laboratori una pràctica diferent. S'han publicat diversos estudis on es tenia en compte l'efecte d'aquest factor sobre alguns dels paràmetres seminals amb resultats contradictoris, de manera que encara està pendent determinar quina és la influència real d'aquest paràmetre analític. Hi ha qui proposa que la temperatura corporal, 37 °C, és la més convenient ja que s'apropa a les condicions fisiològiques a les que es troba la mostra si es produïra el procés reproductiu natural, tanmateix, hi ha altres que pensen que la incubació a aquesta temperatura podria resultar nociva per a la mostra seminal (Thijssen et al., 2014).

La qüestió principal és que no es pot córrer el risc de comprometre la qualitat de la mostra com a conseqüència d'una mala pràctica. Els diferents paràmetres seminals tenen un paper decisiu en l'èxit reproductiu ja que poden afectar a distints nivells del procés, des de la progressió al llarg del tracte genital femení fins a la fecundació, l'establiment de l'embaràs o el desenvolupament embrionari. Les qüestions relatives al procés de l'anàlisi espermàtica cobren fins i tot més importància en homes subfèrtils, la qualitat seminal dels quals ja és molt limitada, atès que l'efecte dels factors del laboratori l'empitjoraria (Thijssen et al., 2014) i podria provocar que la seua mostra es convertirà en inservible, esgotant les seues possibilitats de tindre un fill propi. L'objectiu d'aquest estudi ha estat analitzar l'efecte de la temperatura d'incubació prèvia i durant la realització del seminograma sobre alguns dels paràmetres de qualitat espermàtica per tal de poder establir la temperatura adequada per a portar-ho a terme i estandarditzar els protocols. Val a dir que, com ja s'indicà, el treball forma part d'un conjunt més ampli d'estudis conduents a l'establiment de les condicions òptimes de valoració seminal humana.

Un treball realitzat pel grup d' Apell i Evans als anys 70 on s'estudiava l'efecte de la temperatura, sobre la vitalitat i la mobilitat de la mostra seminal a distints intervals de

temps durant un període d'incubació de 18 hores, va obtenir uns resultats que indicaven un millor manteniment d'aquests paràmetres a temperatura ambient respecte a 37 °C a partir de les 6 hores. Estudis més recents van confirmar la millor preservació de la mostra seminal a TA front a 37 °C, durant un temps d'incubació de 24h (Thijssen et al., 2014) o durant la incubació en mostres desvitrificades (Uribe et al., 2017). Per tant, tenint en compte aquests resultats, la nostra hipòtesi de partida era que hi haguera alguna diferència positiva sobre els paràmetres del seminograma a una temperatura ambient d'incubació. No obstant això, al nostre estudi no s'han observat diferències significatives entre les dues temperatures considerades per als paràmetres del seminograma. Davant aquest fet, s'ha de destacar que la principal diferència entre les condicions del nostre estudi i els anteriors, és el temps d'incubació de la mostra. El nostre temps d'incubació era molt menut, no superava els 70 minuts des de la recol·lecció de la mostra seminal, mentre que en els altres casos era superior. Es pot pensar doncs, que la temperatura sí que té algun efecte sobre els espermatozoides però que aquest començaria a ser rellevant a partir de temps d'incubació més llargs.

Convindria establir a partir de quin temps d'incubació els canvis en els paràmetres espermàtics comencen a resultar significatius per tal d'evitar perjudicar la qualitat de la mostra seminal. Cal fer una distinció doncs, entre unes condicions experimentals (incubacions prolongades) i les condicions d'anàlisi clínica, el que constituïa l'objectiu del present treball, i que no hauria de sobrepassar una hora després d'obtinguda la mostra (OMS, 2010). Com que la mostra seminal es pot obtenir, normalment, d'una manera ràpida i simple, es pot programar la seua recol·lecció evitant la incubació durant llargs períodes de temps. Però és cert que poden haver circumstàncies en les quals la mostra requereix incubació més prolongada, com ara quan hi ha necessitat de transport de la mostra, complicacions en la intervenció femenina, incompatibilitat temporal en la programació entre l'obtenció del semen i el tractament femení (Matorras & Hernández, 2007; Sociedad Española de Fertilidad SEF, 2012). En aquestes situacions, i una volta establert el període de temps a partir del qual la temperatura sí que influeix, seria convenient mantenir la mostra a temperatura ambient. En canvi, com ja hem dit, tenint en compte els nostres resultats, durant períodes curts no hi hauria canvis en els

paràmetres subjectius de l'espermograma clàssic entre incubar la mostra a TA o a 37 °C i aleshores resultaria decisió de cada laboratori com actuar amb les mostres.

Un altre aspecte que caldria valorar seria la comoditat i el component econòmic de les dues condicions. Realitzar el seminograma a temperatura ambient és més simple ja que d'aquesta manera es facilita el procediment, s'evita haver d'estar mantenint la mostra a la temperatura adequada en tot moment, no cal disposar d'una placa calefactada al laboratori ni fer consum d'electricitat. A més, malgrat la no ha ver observat diferències dels resultats, sempre és convenient estandarditzar els protocols per facilitar la comparació de resultats entre laboratoris o la realització de projectes multicèntrics (Del Gallego et al., 2017). Amb tot açò, considerem que és més adequat mantenir la mostra durant la seua incubació a temperatura ambient ja que d'aquesta manera es sortejarien diversos impediments a la vegada.

Per altra banda, també val a dir que l'increment de temperatura entre les dues condicions de l'estudi no és molt gran, $\Delta = 14$ °C. Per la qual cosa pot resultar raonable que l'efecte de la temperatura tampoc haja sigut molt gran. Per a futurs treballs, seria interessant comparar l'efecte amb un interval de temperatura major per tal de veure si la diferència també s'incrementa. Aquestes conclusions serien útils sobretot per al maneig de mostres criopreservades, siga per refrigeració (com és comú en diverses espècies animals) siga per ultracongelació, doncs en aquests cassos l'estrès tèrmic a que són sotmeses les cèl·lules és molt superior (Lusignan et al., 2018). En aquests casos, tal vegada la temperatura d'incubació anterior o posterior a la criopreservació podria tindre efecte sobre la qualitat espermàtica final. En canvi, en el cas de mostres que van a ser utilitzades directament, com era la nostra situació, no tindria massa sentit treballar a altres temperatures. Les dues possibles opcions que poden aportar valor són 37 °C, pel fet de ser la temperatura corporal, i temperatura al voltant dels 23 °C, per ser la temperatura ambient habitual.

Tenint en compte aquests dos aspectes, podríem dir que els resultats tenen lògica ja que tant el temps d'incubació com l'increment de temperatura foren molt baixos. Tal vegada l'efecte de la temperatura siga més rellevant en períodes més llargs de temps, a altres

temperatures o en altres etapes del procés. Un aspecte a avaluar en el futur seria la inclusió en l'estudi de pacients amb problemes declarats de fertilitat per veure si en aquests casos la temperatura d'incubació té un efecte més notori.

L'estructura nucleosòmica de l'espermatozoide està basada en protamines, el que ofereix protecció i estabilitat a l'ADN per poder suportar els estressos químics i mecànics als que es sotmet durant el seu recorregut fins al tracte reproductor femení (Ajina et al., 2017). Es podria pensar que una cèl·lula que no haja madurat adequadament i per tant tinga deficiències pel que respecta a aquesta estructura o tinga l'ADN danyat, pugui ser més susceptible a experimentar danys per qualsevol dels factors a que es troba exposada. Per exemple, si els espermatozoides no són madurs o no tenen la cromatina correctament condensada, pot ser que la temperatura els afecte més que aquells que sí que ho són. Com ja s'indicà abans, la integritat de l'ADN és determinant per al desenvolupament embrionari, per la qual cosa la seua protecció en front de les condicions a les que es sotmet els espermatozoides en el seu camí cap a l'oòcit és fonamental.

Tot i que una de les limitacions que té el present estudi és el tamany reduït de la mostra, cal mencionar que aquest no semblaria haver estat un factor limitant, com siga que s'ha observat que el solapament dels resultats a les dues condicions experimentals és molt gran. Això implica que encara que augmentarem el nombre de mostres analitzades, no deuria haver variacions significatives en els resultats. Les nostres dades estan uniformement distribuïdes per la qual cosa es pot dir que la temperatura no aporta cap tendència.

En el present treball no hem obtingut diferències en el nivell de fragmentació observat utilitzant la tècnica del SCD rere una hora d'incubació en funció de la temperatura. La hipòtesi inicial era que el valor mínim de fragmentació hauria de correspondre a les condicions basals, degut a que una cèl·lula sense ADN fragmentat pot fragmentar-lo però no a l'inrevés. Altres paràmetres seminals no aprofitaven com a referència ja que aspectes com la morfometria o la cinètica es poden veure afectats per la temperatura sense que puguem predir quins són els valors considerables com a basals.

Prèviament es va indicar que la temperatura d'incubació afectava significativament el nivell de fragmentació de l'ADN espermàtic (Simonenko et al., 2016), però en aquest cas el període de incubació estava entre les 8 i 24h, arribant a temperatures de 39 °C. Val a dir que en aquest treball més que la temperatura el factor inductor de la fragmentació semblava ser el temps d'incubació, encara i que a menor temperatura la fragmentació també era menor. Per últim cal comentar que la tècnica de valoració de la fragmentació diferia de la que s'ha utilitzat aquí, el que pot introduir un cert biaix en els resultats.

Cal assenyalar altre límit del nostre disseny experimental referit al sistema de mesura emprat. En aquest cas els paràmetres es varen expressar en forma de percentatges de dues categories, tot generant un sistema dicotòmic: viu/mort, normal/anormal, madur/immadur, condensat/no condensat i fragmentat/no fragmentat. Aquest sistema, basat en els actuals criteris de l'OMS, resulta insatisfactori, en primer lloc perquè els límits entre les classes són completament arbitraris en origen, així com pel fet que si es comparen les diferències entre la quantitat de cèl·lules que corresponen a una categoria o a l'altra no es té en compte aquelles que es poden considerar *borderline*. És a dir, potser les cèl·lules si que experimenten algun canvi però no suficientment gran per a ser classificats en l'altra categoria. Així doncs, destaquem que el mètode utilitzat té escassa sensibilitat. Tal vegada si s'hagueren mesurat paràmetres quantitius com ara el tamany del halo a l'anàlisi de fragmentació de l'ADN, o els nivells de tinció en les proves de blaus de anilina i toluidina si s'haurien trobat més diferències. Els softwares corresponents estan, ara per ara, en fase de desenvolupament en el grup en el que he treballat i cal dir que totes les imatges corresponents al present estudi es troben emmagatzemades oportunament per al seu futur estudi.

Tot just, quan hem disposat d'aquesta funcionalitat hem pogut observar que, malgrat no trobar diferències entre el percentatge de cèl·lules normals en les dues temperatures considerades, hi ha hagut diferències morfomètriques, observades en el present treball. De forma paral·lela, altre treball (Navarro-Sotos et al., comunicació personal) s'han evidenciat diferències en la cinètica de les mostres aquí emprades.

Centrant-nos en els nostres resultats de morfometria, s'ha observat que els paràmetres analitzats són significativament majors quan s'han incubat a temperatura ambient front a 37 °C, a excepció de tres dels paràmetres de forma. En tot cas, cal fer una nova observació al mètode utilitzat, com siga que per tal d'analitzar la morfometria dels espermatozoides, es varen tenyir mitjançant la tècnica de Diff-Quick. Cal ser conscients que allò que es va observar realment és com es comporta la cèl·lula front la tinció, per tant l'anàlisi va ser referent al tamany i la morfologia d'allò que s'havia tenyit. És a dir, en aquest cas com que la mostra va passar per dues condicions de temperatura d'incubació distintes va provocar que aquestes sofriren certs canvis que comportaren una resposta diferencial a la tinció. En el procés de tinció va a ser molt més important el grau de deshidratació de la cèl·lula que la temperatura d'incubació.

Així mateix, durant el temps d'incubació pot ser que a causa de l'efecte de la temperatura, els espermatozoides hagueren patit canvis estructurals o tal vegada hagueren sigut canvis a nivell bioquímic o de reordenaments dels components de la membrana. Arran d'aquesta qüestió, no podem concloure que la temperatura haja afectat aquestes cèl·lules de manera que hagen canviat el seu tamany i morfologia sinó que tan sols es pot afirmar que la resposta al procés de tinció ha sigut diferencial. Un clar exemple el vegem en la variació de l'acrosoma, que mostra ser més gran després de ser incubat a temperatura ambient, encara que realment no podem dir que ho siga, sinó que la vesícula acrosòmica s'ha tenyit diferencialment de manera que hi ha més zona sense tenyir. A partir d'aquests resultats es podria tractar d'esbrinar que és el que ocorre en realitat, és a dir, si és un canvi estructural o sols un canvi de comportament front la tinció. Podem pensar que a temperatura més elevada, 37 °C, les cèl·lules concentren més els seus components per tal de protegir el seu material genètic i per tant són més menudes, també podria ocórrer el contrari a temperatura ambient o inclòs que no passe res d'això. És per açò que pot resultar interessant concretar més al detall sobre quins elements està fent l'efecte el canvi de temperatura. A més, com que els paràmetres a temps 0 no es varen mesurar, tampoc podríem determinar si els espermatozoides a temperatura ambient són els que s'han fet més grans o són els espermatozoides a 37 °C els que han reduït el seu volum.

Cal destacar que una solució a l'ambigüitat dels resultats morfomètrics derivats de la tinció esmentada podria ser el fet que aquestes mateixes cèl·lules també varen ser capturades després de ser tractades mitjançant altra tècnica que no requereix tinció. Es tracta d'un nou mètode per a l'anàlisi morfològic, Trumorph[®], que es fonamenta en la preparació *in vivo* d'espermatozoides immobilitzats entre un portaobjectes i un cobreobjectes convencional, després de posar-los sobre una base a 60 °C durant 5 segons i sotmesos a una pressió de 5 quilopascals (kp). S'aconsegueix una distribució homogènia de la gota amb la mostra en tota l'àrea del cobreobjectes, que obliga a les cèl·lules a disposar-se conforme a la seua màxima projecció (Soler, García-Molina, Contell, Silvestre, & Sancho, 2015). Les mostres s'han d'observar amb microscòpia de contrast de fase negativa a 40x i les captures obtingudes es podran analitzar mitjançant el mòdul de morfometria del sistema ISAS. El software corresponent per a portar a terme el correcte anàlisi d'aquestes captures encara es troba en desenvolupament de manera que no es va poder realitzar. No obstant, queda pendent aquest anàlisi, les dades del qual ens proporcionaran uns resultats més consistents per a poder determinar l'efecte real de la temperatura sobre la morfologia dels espermatozoides. Amb l'ús d'aquesta nova tecnologia s'aconseguirà sobrepassar els impediments que comporten mètodes convencionals basats en fixació i tinció que produeixen artefactes i no són totalment representatius de la morfologia cel·lular sinó, com ja hem repetit diverses vegades, de la tinció que adquireix la cèl·lula .

S'ha d'afegir que ja hi ha evidències científiques de que variacions de temperatura provoquen canvis morfomètrics en el cap del espermatozoide. Concretament, els canvis s'han observat en el procés de criopreservació (Soler et al., 2006). És cert que aquest és un procés molt més extrem però al cap i a la fi també es tracta d'un canvi en la temperatura. Per tant, resulta lògic voler tractar de comprovar si quan la temperatura varia en el rang positiu, temperatura ambient i 37 °C, com era el nostre cas, es produeix el mateix fenomen. Per als canvis morfològics produïts en la criopreservació s'han proposat distints possibles mecanismes com canvis osmòtics, dany acrosòmic i alteracions en la condensació de la cromatina (Soler et al., 2006). Aleshores també podria comprovar-se si ocorre algun d'aquest mecanismes en les condicions del nostre treball.

Per altra part, també requereix tindre en compte el fet que la morfologia condiona la fertilitat del baró (Saravia et al., 2007; Rappa et al., 2016; Oumaima et al., 2018). Tot i que amb les dades obtingudes per l'anàlisi del seminograma hem determinat que no hi ha diferència significativa entre les dues condicions, en el cas dels paràmetres morfomètrics sí. Per aquesta raó, un dels següents passos podria ser tractar de veure si aquests canvis morfomètrics tenen alguna influència sobre l'èxit reproductiu. Aquesta informació seria molt útil per tal de determinar quina és la temperatura d'incubació més adequada.

Paral·lelament també seria interessant veure si es poden correlacionar els canvis morfomètrics detectats amb el percentatge de cèl·lules immadures, poc condensades o amb l'ADN fragmentat ja que hi ha estudis que evidencien la relació entre ambdós factors. Es pot pensar que la condensació de la cromatina dels espermatozoides va a condicionar la forma del cap ja que una de les principals característiques d'aquest empaquetament exclusiu dels espermatozoides basat en protamines és que aconseguen reduir el volum del nucli. Per tant, si la condensació no s'ha produït correctament o les cèl·lules no estan totalment madures, potser siguen més susceptibles als canvis de temperatura i aleshores es deforme el cap de l'espermatozoide.

Val tornar a dir, que aquestes proves addicionals sols tindrien sentit una vegada es determinara que els canvis observats no són solament producte d'una tinció diferencial.

6. CONCLUSIONS

1. No s'han trobat diferències en els paràmetres de qualitat espermàtica que conformen el seminograma, segons l'OMS, respecte a la incubació i l'anàlisi de les mostres seminals a temperatura ambient o a 37 °C.
2. Les diferències en els paràmetres morfomètrics de les mostres seminals incubades en les dues condicions esmentades indiquen que la resposta al procés de tinció ha sigut diferencial com a conseqüència de la temperatura.
3. Cal disposar d'eines analítiques quantitatives que incrementen la sensibilitat de les mesures relatives a l'estat de l'ADN espermàtic.
4. L'anàlisi del seminograma subjectiu, segons l'OMS es pot considerar independent de la temperatura d'incubació en el temps requerit per a la realització del seminograma.
5. Les diferències morfomètriques condueixen al fet que no es puguin extrapolar resultats si el protocol no es fa a la mateixa temperatura.
6. Es requereix més investigació per establir la temperatura d'incubació i anàlisi del seminograma i poder estandarditzar el protocol.
7. L'estandardització del protocol del seminograma permetrà obtenir unes dades representatives de l'estat de la mostra per poder fer un diagnòstic adequat de la fertilitat del baró.

7. REFERÈNCIES

- Ajina, T., Ammar, O., Haouas, Z., Sallem, A., Ezzi, L., Grissa, I., Sakly, W., Jlali, A., & Mehdi, M. (2017). Assessment of human sperm DNA integrity using two cytochemical tests: Acridine orange test and toluidine blue assay. *Andrologia*, *49*(10), 1-6.
- Álvarez, J. G. (2006). New advances in the study of sperm nuclear DNA integrity. *ASEBIR*, *11*(1), 14-22.
- Apell, R. A., & Evans, P. R. (1977). The effect of Temperature on Sperm Motility and Viability. *Fertility and Sterility*, *28*(12), 1329-1332.
- Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W. G., Behre, H. M., Haugen, T. B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M. T., & Vogelsong, K. M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, *16*(3), 231-245.
- Dashti, G. R., Nateghian, Z., & Golshan Iranpour, F. (2018). Effect of preservation of human semen sample at 4 – 6 and 25 ° C on sperm motility. *Cell and Tissue Banking*, *19*(4), 653-658.
- De Geyter, C., Calhaz-Jorge, C., Kupka, M. S., Wyns, C., Mocanu, E., Motrenko, T., Scaravelli, G., Smeenk, J., Vidakovic, S., & Goossens, V. (2018). ART in Europe, 2014: Results generated from European registries by ESHRE. *Human Reproduction*, *33*(9), 1586-1601.
- Del Gallego, R., Sadeghi, S., Blasco, E., Soler, C., Yániz, J.L., & Silvestre, M.A. (2017) Effect of chamber characteristics, loading and analysis time on motility and kinetic variables analysed with the CASA-mot system in goat sperm. *Animal Reproduction Science* *177*, 97–104.
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*, *24*(1), 59-66.
- Holt, W. V., Cummins, J. M., & Soler, C. (2018). Computer-assisted sperm analysis and reproductive science ; a gift for understanding gamete biology from multidisciplinary perspectives. *Reproduction, Fertility and Development*, *30*(6), 3-5.
- Hosseini, A., & Khalili, M. A. (2017). Improvement of motility after culture of testicular spermatozoa : the effects of incubation timing and temperature. *Translational Andrology and Urology*, *6*(2), 271-276.
- Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Pinotti, R., & Swan, S. H. (2017). Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction Update*, *23*(6), 646-659.
- Lusignan, M. F., Li, X., Herrero, B., Delbes, G., & Chan, P. T. (2018). Effects of different

- cryopreservation methods on DNA integrity and sperm chromatin quality in men. *Andrology*, 6, 829-835.
- Matorras, R., & Hernández, J. (eds). (2007). *Estudio y tratamiento de la pareja estéril: recomendaciones de la SEF, ASEBIR y ASES*. Madrid: Adalia.
- Mendiola, J., Ten, J., Vivero, G., Roca, M., & Bernabeu, R. (2005). Sterility & assisted reproduction: A history perspective. *Revista iberoamericana de fertilidad*, 22(1), 15-22.
- Nava-Trujillo, H., Hernández-Fernández, A., & Quintero-Moreno, A. (2012). Chromatin Integrity and Shape Head of Bull Sperm : Simultaneous Assessment. *Revista científica*, XXII(3), 211-216.
- OMS, O. M. de la S. (2010). *Examination and processing of human semen* (5ª). Ginebra, Suïssa.
- Oumaima, A., Tesnim, A., Zohra, H., Amira, S., Ines, Z., Sana, C., Intissar, G., Lobna, E., Ali, J., & Meriem, M. (2018). Investigation on the origin of sperm morphological defects: oxidative attacks, chromatin immaturity, and DNA fragmentation. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 13775-13786.
- Pandiyan, N., Pandiyan, R., & Raja, D. R. (2017). A perspective on sperm DNA fragmentation. *Translational Andrology and Urology*, 6(S4), 661-664.
- Pourmasumi, S., Khoradmehr, A., Rahiminia, T., Sabeti, P., Talebi, A. R., & Ghasemzadeh, J. (2019). Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. *Journal of reproduction & infertility*, 20(2), 95-101.
- Rappa, K. L., Rodriguez, H. F., Hakkarainen, G. C., Anchan, R. M., Mutter, G. L., & Asghar, W. (2016). Sperm processing for advanced reproductive technologies : Where are we today ? *Biotechnology Advances*, 34(5), 578-587.
- Registro Nacional de Actividad 2016 - Registro SEF Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida. (2018). En *Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social*.
- Saravia, F., Núñez-Martínez, I., Morán, J. M., & Soler, C. (2007). Differences in boar sperm head shape and dimensions recoded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology*, 68, 196-203.
- Simonenko, E. Y., Garmaeva, S. B., Yakovenko, S. A., Grigorieva, A. A., & Tverdislov, V. A. (2016). The Influence of the Storage Temperature and Cryopreservation Conditions on the Extent of Human Sperm DNA Fragmentation. *Byophysics*, 61(2), 267-270.
- Sociedad Española de Fertilidad SEF. (2012). *Saber más sobre Fertilidad y Reproducción Asistida*. Madrid: MSH impresores.

- Soler, A. J., Montoro, V., & Garde, J. J. (2006). The Effects of Cryopreservation on the Morphometric Dimensions of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Sperm Heads. *Reprod Dom Anim*, *41*, 241-246.
- Soler, C, García-Molina, A., Contell, J., Silvestre, M. A., & Sancho, M. (2015). The Trumorph® system: The new universal technique for the observation and analysis of the morphology of living sperm. *Animal Reproduction Science*, *158*.
- Soler, Carles, Cooper, T. G., Valverde, A., & Yániz, J. L. (2016). Afterword to Sperm morphometrics today and tomorrow special issue in Asian Journal of Andrology. *Asian Journal of Andrology*, *18*, 895-897.
- Thijssen, A., Klerkx, E., Huyser, C., Bosmans, E., Campo, R., & Ombelet, W. (2014). Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, *28*(4), 436-442.
- Tiegs, A. W., Landis, J., Garrido, N., Scott, R., & Hotaling, J. (2018). Total motile sperm count trend over time across two continents: evaluation of semen analyses from 119,972 infertile men. *Fertility and Sterility*, *110*(4), e27.
- Uribe, P., Rojas, C., Meriño, J., Zambrano, F., Villegas, J. V, Treulen, F., Boguen, R., Isachenko, V., Isachenko, E., & Sánchez, R. (2017). Cryobiology Effect of incubation temperature after devitri fication on quality parameters in human sperm cells. *Cryobiology*, *79*, 78-81.
- Yániz, J. L., Silvestre, M. A., Santolaria, P., & Soler, C. (2018). CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility and Development*, *30*(6), 799-809.
- Zini, A., & Libman, J. (2006). Sperm DNA damage: Importance in the era of assisted reproduction. *Current Opinion in Urology*, *16*(6), 428-434.

1. L'espermatzoide

L'espermatzoide és una cèl·lula haploide molt especialitzada que constitueix la gàmeta masculina i té unes característiques peculiars i úniques. És una de les cèl·lules més menudes (Velázquez Cornejo, 2009), mòbil i sense reserves. És l'encarregada de transportar el genoma patern a l'òvul (Enciso Lorences, 2009).

Estructura de l'espermatzoide

L'espermatzoide està compost principalment per un cap i una cua o flagel recoberts per una membrana plasmàtica (Figura I).

El cap del espermatzoide, que mesura 2-3 μm d'ample i 4-5 μm de longitud, té una forma ovalada i està format per l'acrosoma i el nucli (Olivera et al., 2006) (Figura I).

L'acrosoma és una gran vesícula secretora que conté proteases que afavoreixen la penetració de l'espermatzoide en l'òocit. Consta d'una membrana externa que s'elimina en la reacció acrosòmica, i una membrana interna que posseeix molècules receptores que permeten la interacció de l'espermatzoide amb la zona pel·lúcida de l'òocit després de la reacció acrosòmica (Enciso Lorences, 2009).

El nucli està format per ADN hipercondensat, gràcies a la unió a protamines. A més, es troba recobert per un embolcall nuclear reduït sense porus i per la teca perinuclear, dividida en tres subregions, que li confereix resistència i protecció (Enciso Lorences, 2009).

Ambdós estan envoltats per una xicoteta quantitat de citoplasma i recoberts per una membrana plasmàtica. Aquesta membrana té alts nivells d'àcids grassos poliinsaturats (Sadeghi Khomami, 2018).

La cua de l'espermatzoide, amb una longitud de 50 μm aproximadament, consisteix en un flagel molt especialitzat (Olivera et al., 2006). Està format pel coll (conté un centríol), la peça mitjana (envoltada per una hèlix de mitocòndries que proporcionen a l'espermatzoide l'energia necessària per al moviment), la peça principal i la peça terminal. El flagel proporciona mobilitat a l'espermatzoide. Consta d'una organització de microtúbuls en l'axonema, 9+2 (9 dobles de microtúbuls perifèrics connectats mitjançant braços de dineïna i un parell de microtúbuls central) envoltats per 9 fibres denses externes que proporcionen flexibilitat i consistència a l'estructura durant el moviment (Enciso Lorences, 2009) (Figura I).

Destacar que per a maximitzar la seua eficiència transportadora, aquestes cèl·lules no tenen ribosomes, reticle endoplasmàtic ni aparell de Golgi (Velázquez Cornejo, 2009).

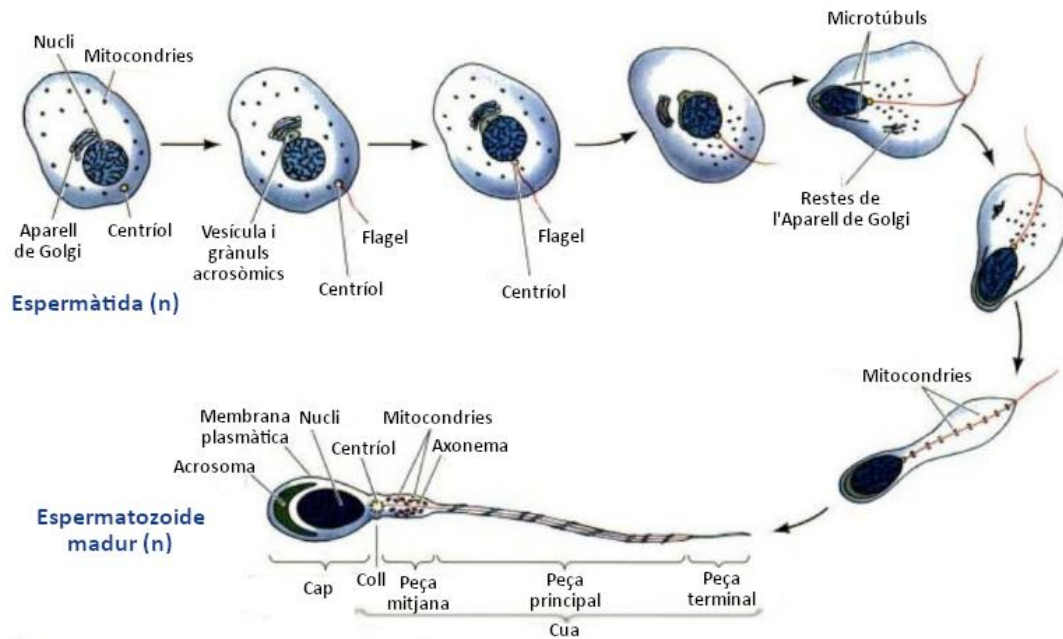


Figura I. Espermioogènesi i estructura de l'espermatozoide. Es produeix una modificació d'una cèl·lula germinal per a formar un espermatozoide que consisteixen que el centríol produeix un llarg flagel en el qual estarà l'extrem posterior de l'espermatozoide, i l'aparell de Golgi forma la vesícula acrosòmica a l'extrem anterior. Les mitocondries es disposen al voltant del flagel prop de la base del nucli i s'incorporen a la peça mitjana de l'espermatozoide. El citoplasma que resta s'elimina i el nucli es condensa. El tamany de l'espermatozoide madur s'ha augmentat relativament en relació als altres estats. A l'espermatozoide madur s'observen les parts d'aquest. Imatge modificada de Gilbert, 2005.

ADN de l'espermatozoide

El nucli dels espermatozoides conté 23 parells de cromosomes ja que es tracta d'una cèl·lula haploide. L'ADN dels espermatozoides està extremadament condensat, és l'ADN eucariòtic més condensat, gràcies als seus components estructurals i la seua organització específica (Enciso Lorences, 2009).

Aquesta cèl·lula és molt menuda, per tant, no disposa de suficient volum per albergar l'ADN empaquetat com la resta de les cèl·lules somàtiques (ADN enrotllat sobre octàmers d'histones formant els nucleosomes que s'organitzen en hèlixs regulars per a formar els solenoides) i requereix una organització de la cromatina distinta (Enciso Lorences, 2009; Sadeghi Khomami, 2018).

Una de diferències més significatives és l'associació de l'ADN amb les protamines en comptes d'amb histones. Les protamines són proteïnes molt bàsiques de baix pes molecular, riques en l'aminoàcid arginina (55-70%) i cisteïna (Hou et al., 1995) i menudes, tenen la mitat de tamany que les histones (Enciso Lorences, 2009; Sadeghi Khomami, 2018). Les protamines reemplacen les histones, i el procés mitjançant el qual s'hi produeix, es detalla més endavant.

El model d'empaquetament proposat, descriu que les protamines adopten una estructura estesa de manera que el seu segment central ric en arginina, s'uneix al solc menor de l'ADN. Aquesta unió neutralitza les càrregues negatives dels grups fosfat de l'ADN de tal manera que desapareix la repulsió electrostàtica i els complexos ADN-

protamines pròxims podem aproximar-se i unir-se íntimament. A més, per a minimitzar el volum, la part de les protamines que no està unida a aquest solc, es col·loca en el solc major de les molècules d'ADN adjacents. D'aquesta manera, els solcs menors d'una molècula es juxtaposen amb els solcs majors de la següent (Enciso Lorences, 2009). Per altra banda, els complexos ADN-protamines s'uneixen els uns als altres lateralment mitjançant forces de Van de Waals i ponts disulfur entre els residus de cisteïna (Ajina et al., 2017). Aquestes estructures s'organitzen sobre una matriu nuclear formant uns bucles, en aquest cas, més xicotets que els de les cèl·lules somàtiques (Figura II). L'eliminació dels nucleosomes genera una gran nombre de superenrotllaments lliures que s'han d'eliminar mitjançant la introducció de ruptures de cadena senzilla o doble en l'ADN. Cal destacar que l'ADN no presenta superenrotllament, per tant, està organitzat de manera més compacta però menys superenrotllat (Enciso Lorences, 2009).

Per últim, amb aquest empaquetament basat en les protamines s'aconsegueix una bona estabilitat i protecció a aquest material genètic (Zini & Libman, 2006; Ajina et al., 2017) però encara són susceptibles al dany. Per tant, l'adequada organització de la cromatina en l'espermatozoide és important per a protegir-lo dels efectes nocius de molts agents genotòxics (Zini & Libman, 2006; Enciso Lorences, 2009).

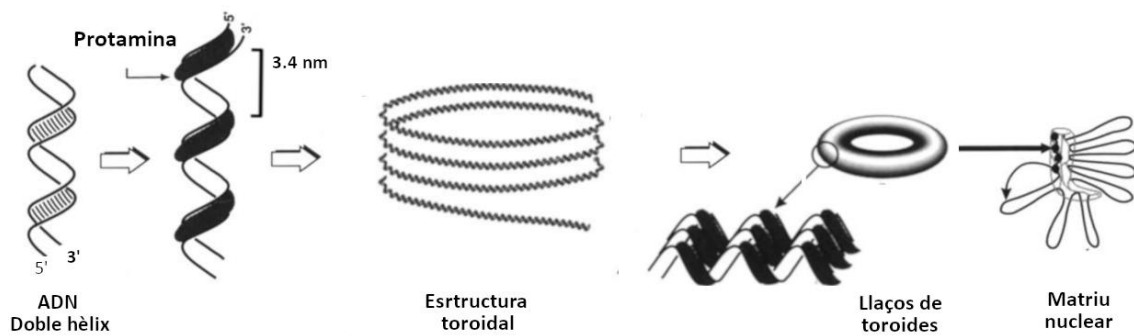


Figura II. Nivells d'empaquetament de l'ADN al nucli d'una cèl·lula espermàtica. En el nucli de l'espermatozoide, les protamines carregades positivament s'uneixen al llarg de la doble hèlix d'ADN neutralitzant les seues càrregues negatives. L'ADN unit amb protamines s'enrotlla formant un complex de cercles concèntrics, estructura toroidal. Aquests cercles d'un llaç, es col·lapsen després en un toroide en els qual els complexos neutre d'ADN-protamina s'uneixen estretament mitjançant forces de Van der Waals). Cada toroide representa un domini de llaç d'ADN unit a la matriu nuclear de l'espermatozoide. Els dominis del bucle d'ADN dels nuclis dels espermatozoides són més petits que els de les cèl·lules somàtiques. Imatge modificada de Steven Ward, 1993.

Formació de l'espermatozoide

La formació de l'espermatozoide es porta a terme mitjançant un procés complex de diferenciació cel·lular (Oumaima et al., 2018). Es porta a terme primerament el procés d'espermatogènesi a les gònades masculines, els testicles, i està controlat hormonalment per l'eix hipòfisi-hipotàlem-gònada (Olivera et al., 2006). Seguidament es produeix l'espermioogènesi i finalitza amb l'etapa de maduració.

Les cèl·lules germinals primordials (espermatogònies), els primers precursors de les gàmetes, s'originen fora de les gònades (testicles) i migren a elles, concretament als tubs seminífers, durant els primers estadis del desenvolupament embrionari. Una vegada hi

arriben, les espermatogònies comencen una fase de proliferació mitòtica ràpida (en cada divisió es produeixen dues cèl·lules diploides idèntiques) que resulta en un augment exponencial de centenars a milers d'aquestes cèl·lules. Com a resultat els tubs seminífers testiculars estan revestits d'una població germinal d'espermatogònies, que van experimentat mitosis periòdiques ja que les cèl·lules germinals masculines mantenen la capacitat de dividir-se al llarg de tota la vida postnatal (moltes de les cèl·lules es mantenen en el cicle mitòtic durant gran part de la vida reproductora dels barons). Les espermatogònies estan connectades entre elles mitjançant ponts citoplasmàtics intercel·lulars i a més es troben retingudes a la base del epiteli seminífer per prolongacions de les cèl·lules de Sertoli (cèl·lula nutritiva). Posteriorment, després de la pubertat, comença la meiosi de les cèl·lules originades en grups sincrònics. Quan els descendents d'un espermatogoni han entrat al cicle meiòtic, com espermatòcits primaris, tarden diverses setmanes en concloure la primera divisió meiòtica. Durant aquest temps, porten a terme una síntesi preparatòria de molècules d'ARNm que seran emmagatzemades de forma inactiva (formen complexos amb proteïnes per a ser inaccessibles a la maquinària de traducció) fins que siga requerida la síntesi de la proteïna adequada, quan els canvis han d'esdevenir ràpidament. Entre aquestes molècules trobem els precursors de les protamines que substituiran les histones en la espermiogènesi, per tant aquests ARNm no hauran de traduir-se fins a la fase d'espermàtides (Si es tradueixen abans, els cromosomes es compacten de manera prematura i es produeix esterilitat). El resultat de la primera divisió meiòtica és la formació de dos espermatòcits secundaris, que entraran immediatament en la segona divisió meiòtica. Unes 8 hores després acaba i com a descendent d'un únic espermatòcit primari, s'originen quatre espermàtides que són gàmetes immadures haploides (n) (Olivera et al., 2006; Carlson, 2014).

Les espermàtides malgrat que no es divideixen més, si que experimenten una sèrie de canvis profunds que les transformen des de cèl·lules comunes a espermatozoides altament especialitzats. Aquests processos de transformació d'espermàtides a espermatozoides es coneix com a espermiogènesi i s'hi produeixen diversos canvis importants. Els principals, consisteixen en la formació del acrosoma a partir de les vesícules de l'aparell de Golgi, condensació i elongació del nucli, aquest redueix el seu tamany, adquireix un aspecte oval o piriforme i es torna més dens, la condensació del material cromosòmic es produeix per la substitució d'histones per protamines (les histones nuclears es reemplacen primerament per proteïnes transitòries i finalment per protamines després de l'oxidació dels ponts disulfur). Degut a aquesta compactació, no pot haver replicació ni transcripció, per tant, el espermatozoide va a ser dependent de modificacions postranscripcionals. Per altra banda, també es produeix la formació d'un flagel movable a partir dels centríols, acumulació de les mitocòndries a la part anterior del flagel per a formar la peça mitjana i un desprendiment extensiu de citoplasma (Figura I). En aquest punt, els espermatozoides són madurs morfològicament. Però immòbils e incapaçs de fecundar l'òocit (Olivera et al., 2006; Carlson, 2014; Hosseini & Khalili, 2017).

Aquest procés conclou amb l'espermiació, fase en la qual els espermatozoides diferenciats es separen de l'epiteli seminífer i s'alliberen a la llum del tub seminífer per dirigir-se a l'epidídim on es produirà la seua maduració i s'emmagatzemaran fins el

moment de l'ejaculació. Aquest espermatozoides tenen part del citoplasma al voltant del coll formant la gota citoplasmàtica, aquesta s'eliminarà amb el trànsit per l'epidídim. També es formaran ponts disulfur en el nucli i algunes estructures del flagel i es produiran diverses modificacions en l'estructura de la membrana plasmàtica (efectes sobre la mobilitat, capacitat i reacció acrosòmica)(Hosseini & Khalili, 2017). Per tant, una vegada finalitzat aquest procés, resulta una cèl·lula, l'espermatozoide, molt especialitzada i correctament adaptada per al moviment i la cessió del seu ADN a l'oòcit (Enciso Lorences, 2009). Cal destacar que al tracte genital femení, durant la capacitat, també es produeixen canvis morfològics i químics que el fan apte per fecundar l'oòcit (Rappa et al., 2016).

2. Danys en l'ADN de l'espermatozoide

Hi ha distints nivells i tipus de dany sobre l'ADN: dany a les cadenes tant dobles com simples, defectes en les proteïnes nuclears que desencadenen errors de compactació i anomalies estructurals en la cromatina que produeixen alteracions en la estructura terciària d'aquesta (Sadeghi Khomami, 2018). El mecanisme exacte pel que es produeixen anomalies a nivell de la cromatina nuclear espermàtica no es coneix, però se n'han proposat diverses causes. Entre els orígens intrínsecs trobem: en primer lloc, es creu que podria ser resultat d'un empaquetament anormal de la cromatina durant l'espermioogènesi; en segon lloc, com a conseqüència d'una apoptosi defectuosa abans de l'ejaculació; i per últim, induït per la producció excessiva d'espècies reactives d'oxigen (ROS) en l'ejaculat (Enciso Lorences, 2009; Sadeghi Khomami, 2018). També pot tenir un origen extrínsec (Sadeghi Khomami, 2018).

El més probable és que la presència d'ADN danyat a un espermatozoide madur siga el resultat de la combinació de diferents processos, ja que els mecanismes proposats podrien operar conjuntament. Per exemple, és fàcil pensar que el dany generat per ROS estiga associat amb un procés apoptòtic o que la presència de ruptures per una espermioogènesi anormal es senyalitze per a la seua eliminació mitjançant apoptosis (Enciso Lorences, 2009).

Empaquetament i remodelació anormal de la cromatina espermàtica

Com ja hem explicat prèviament, en l'espermioogènesi es produeix una reorganització de la cromatina espermàtica en la que es reemplacen del 85-95% de les histones per protamines (Sadeghi Khomami, 2018) per a aconseguir un empaquetament més extrem. En aquest procés es necessària l'activitat de nucleases endògenes que tallen i lliguen l'ADN durant la seua protaminació i l'empaquetament de la cromatina (Álvarez, 2006; Enciso Lorences, 2009). Per tant, alteracions, en el control d'aquest procés o errors en la reparació d'aquests talls podria provocar que l'espermatozoide acabara amb l'ADN fragmentat i aquestes ruptures en l'ADN dels espermatozoides de l'ejaculat podrien ser indicatives d'un procés de maduració incomplet (Álvarez, 2006; Enciso Lorences, 2009). Aquestes alteracions, per tant es produïrien abans de l'espermioogènesi completa. Altre cas ocorre si durant el reemplaçament la proporció entre els dos tipus de protamines (P1 y P2) es anormalment alta o baixa (1:1 proporció normal), s'associa amb una major

fragmentació de l'ADN de l'espermatozoide (Oumaima et al., 2018; Sadeghi Khomami, 2018).

Apoptosi defectuosa

Durant les fases finals de l'espermatogènesi, els sistemes de regulació de la reparació de l'ADN poden permetre que les cèl·lules germinals masculines tinguin una major possibilitat de dany a l'ADN, ja que el mecanisme cel·lular que desencadena l'apoptosi completa no funciona durant aquest procés (Sadeghi Khomami, 2018). A més, en els testicles, les cèl·lules germinals s'expandeixen clonalment en diverses rondes de mitosi abans de la seua diferenciació a espermatozoides madurs. Degut a que l'expansió es excessiva, s'ha d'equilibrar mitjançant un mecanisme d'apoptosi selectiu (Enciso Lorences, 2009), per tant, té lloc un *screening* cel·lular important que resulta en la inducció d'apoptosi en un 50-60% de les cèl·lules germinals que entren en la meiosi I. Aquestes cèl·lules es marquen de manera primerenca amb marcadors apoptòtics del tipus Fas, Fas, fosfatidilserina, Bcl-XL i p53 per a ser eliminades per les cèl·lules de Sertoli. No obstant, hi ha casos en els que es produeix un *screening* defectuós i un percentatge variable d'aquestes cèl·lules acaben desembocant-se a l'espermioogènesi i apareixen a l'ejaculat (Álvarez, 2006) raó per la qual podem trobar-hi espermatozoides amb dany en l'ADN i/o funcions bioquímiques irregulars o anormals morfològicament (Enciso Lorences, 2009). La presència de marcadors apoptòtics en els espermatozoides podria ser el resultat d'una apoptosi abortiva i també d'una apoptosi iniciada després de l'ejaculació (Enciso Lorences, 2009).

Producció excessiva de ROS en l'ejaculat

L'estrès oxidatiu és un trastorn que reflexa un desequilibri entre l'expressió de ROS i la capacitat del sistema biològic per a eliminar els productes reactius intermediaris (defenses antioxidants) o per a reparar el dany resultant (Rappa et al., 2016). Cal destacar que la presència de baixos nivells de ROS és necessària per a la correcta funcionalitat espermàtica (Zini & Libman, 2006; Rappa et al., 2016; Oumaima et al., 2018) però no obstant, la presència d'estrès oxidatiu en el tracte reproductiu masculí es produeix quan hi ha una producció excessiva de ROS per part dels leucòcits activats i/o macròfags dels espermatozoides anormals i/o es produeix una disminució de la capacitat antioxidant del semen, i la producció de ROS supera l'activitat dels agents antioxidants presents al plasma seminal (Zini & Libman, 2006; Enciso Lorences, 2009; Oumaima et al., 2018). Els espermatozoides són sensibles a l'estrès oxidatiu per la naturalesa lipídica de la seua membrana. La peroxidació dels àcids grassos poliinsaturats genera peròxids que tenen un efecte perjudicial sobre els espermatozoides alterant la integritat del seu ADN i aquest procés ocorre quan els electrons dels lípids estan exposats a les ROS (Sadeghi Khomami, 2018). Les ROS són agents oxidants altament reactius que poden provocar ruptures en l'ADN (Enciso Lorences, 2009; Pandiyan et al., 2017).

Per altra banda, també s'ha demostrat que els espermatozoides immadurs produeixen alts nivells de ROS i que aquests poden induir dany en l'ADN dels espermatozoides madurs. Aquest dany es produiria després de l'espermioació, durant la migració dels espermatozoides, tant madurs com immadurs, des dels tubs seminífers a l'epidídim. Les ROS induirien fragmentació d'ADN a nivell de l'epidídim bé siga actuant directament sobre el material genètic o amb l'activació d'endonucleases i caspases espermàtiques.

A més, el propi epidídim podria jugar també un paper actiu en la inducció de la fragmentació de l'ADN dels espermatozoides ja siga produït per els radicals lliures com l'anió superòxid, el radical hidroxil o l'òxid nítric, o bé mitjançant l'activació d'enzims espermàtiques pels agents tòxics o factors epididimaris. Tal vegada, els espermatozoides amb major ADN danyat siguin aquells que hagen adquirit un menor grau d'entrecruament per ponts disulfur en la cromatina durant la seua maduració a l'epidídim (el grau de fragmentació en els espermatozoides de l'ejaculat es major que el dels testiculars)(Álvarez, 2006).

Altres factors extrínsecs

Hi ha altres factors físics i químics que poden afectar l'ADN dels espermatozoides, realment aquests factors el que farien seria activar les endonucleases i caspases espermàtiques que fragmentarien el material genètic (Álvarez, 2006). Entre ells podem trobar: la temperatura elevada tant per un procés febril com per un entorn laboral inapropiat, l'exposició a tòxics ambientals o industrials, el tabac, la cafeïna, el càncer, la quimioteràpia i la radioteràpia (Álvarez, 2006; Enciso Lorences, 2009), deficiències hormonals, edat avançada, sobrepès (Enciso Lorences, 2009), varicocele, abstinència, infecció bacteriana, reaccions a procediments clínics, medicaments o vacunes, tractaments antiretrovirals (Zini & Libman, 2006; Sadeghi Khomami, 2018).

3. Paràmetres de qualitat espermàtica de l'OMS

Paràmetres espermàtics	Valors manual OMS 2010
Volum (mL)	1,5
Concentració espermàtica (10^6 /mL)	15
Concentració espermàtica total (10^6)	39
Mobilitat total (% mòbils)	40
Mobilitat progressiva (% a+b)	32
Vitalitat (% vius)	58
Morfologia	4

Taula I. Valors de referència per als paràmetres de qualitat espermàtica humans publicats a la 5a edició del manual de l'OMS del 2010. Tipus a= mobilitat progressiva ràpida ($>25 \mu\text{m/s}$); Tipus b= mobilitat progressiva lenta ($5-25 \mu\text{m/s}$). Dades obtingudes de OMS, 2010.

4. Anàlisi dels paràmetres espermàtics relacionats amb l'ADN i la cromatina

Els assajos citoquímics, entre els quals s'inclouen les tincions blau d'anilina i blau de toluidina, es basen en la capacitat d'alguns colorants d'avaluar la conformació de la cromatina espermàtica que depèn de la interacció de l'ADN amb proteïnes específiques.

Els avantatges d'aquets tests són la rapidesa, precisió, simplicitat, baix preu i utilització d'instrumentació bàsica (microscopi de llum) (Pourmasumi et al., 2019).

La tinció **blau d'anilina** discrimina entre les histones, que són proteïnes riques en lisina, y les protamines, proteïnes més bàsiques riques en arginina i cisteïna. Hi ha que tindre en compte que la transició d'histones a protamines durant l'espermatogènesi neutralitza la càrrega de l'ADN i disminueix l'absorció de colorants ADN-específics. Per tant aquesta tinció revela diferències en la composició proteica del nucli dels espermatozoides humans, cosa que permet avaluar la maduració de la cromatina. El blau d'anilina té una relació positiva per a la lisina, és a dir, és capaç de tenyir les histones persistents al nucli espermàtic (Sati & Huszar, 2013; Pourmasumi et al., 2019). Un nivell elevat d'histones al nucli espermàtic és indicatiu d'algun defecte durant el procés de transició histona-protamina (espermatogènesi), i açò afecta significativament al plegament de la cadena d'ADN (Hou et al., 1995). Per tant aquells espermatozoides amb el nucli tenyit de color blau obscur es consideraran com a immadurs (Hou et al., 1995; Irez et al., 2018). Per contra, aquells espermatozoides rics en protamines no van a interaccionar amb el tint i s'identificaran per tindre un color blau molt clar. Aquests espermatozoides seran els que han madurat correctament (Irez et al., 2018).

Per altra banda, el **blau de toluidina** és un colorant catiònic utilitzat per a la tinció metacromàtica de la cromatina espermàtica ja que s'uneix als residus fosfat carregats negativament de l'ADN del nucli. La cromatina que està més folgada, resultant de una pertorbació en la remodelació de la cromatina (Nava-Trujillo et al., 2012; Ajina et al., 2017), té interaccions molt dèbils entre proteïnes-ADN de manera que les proteïnes poden ser fàcilment desplaçades de l'ADN en favor de la unió del colorant als grups fosfat. La dimerització de les molècules del colorant produeix una alteració metacromàtica d'aquest colorant des del color blau clar fins al morat-violeta (Pourmasumi et al., 2019). Açò ens permet conèixer el estat de la condensació, és a dir el grau de plegament, de la cromatina del nucli espermàtic. Per tant, aquells espermatozoides en els quals la cromatina estiga plegada folgadamente, tindran més llocs d'unió accessibles de manera que seran mes propensos a interaccionar amb el blau de toluidina i com a conseqüència presentaran una coloració violeta (metocromàticament tenyits). En el cas dels espermatozoides amb una condensació normal presentaran pocs llocs d'unió del colorant i per tant no es produirà la polimerització d'aquest i com a resultat es tenyiran de color blau clar (ortocromàticament tenyits) (Ajina et al., 2017; Pourmasumi et al., 2019).

Per últim, detallarem el **test de dispersió de la cromatina espermàtica** (SCD), cal assenyalar que malgrat que no és un assaig citoquímic també comparteix els avantatges abans mencionats, ja que és un mètode ràpid i fàcil (Fernández et al., 2003; Sadeghi Khomami, 2018). El **test de dispersió de la cromatina espermàtica** (SCD) permet avaluar la fragmentació de l'ADN espermàtic. Es basa en el fet que les ruptures en l'ADN augmenten la producció d'ADN de cadena simple (aquestes àrees comencen al final de les ruptures) després de tractar-les amb agents desnaturalitzants. Per tant, quan un nucli conté ADN fragmentat es transforma aquesta regió en motius d'ADN de cadena simple. El test consisteix en introduir els espermatozoides en una matriu d'agarosa (en un portaobjectes) i tractar-los amb una solució àcida per tal de desnaturalitzar l'ADN. Després s'utilitza un tampó de lisis per a eliminar les membranes i les proteïnes, de manera que es formaran uns nucleoides amb un nucli central i un halo perifèric de bucles

d'ADN dispers. Aquells nuclis amb una fragmentació de l'ADN elevada presentaran uns halos molt menuts o sense dispersió ja que tenen àrees d'ADN de cadena simple, mentre que els espermatozoides amb poca fragmentació d'ADN alliberaran els seus llaços d'ADN i formaran halos grans (Fernández et al., 2003).

5. Consentiment informat

SEMINOGRAMA BIOLÓGICO

D. _____

Por la presente, autorizo a que la muestra de semen obtenida en la fecha _____ sea utilizada para el desarrollo de trabajos científicos por parte de la Universidad de Valencia y la empresa Proiser.

Dicha muestra no será utilizada para otro fin y será destruida tras el uso de la porción que sea necesaria para dichos trabajos, que, en ningún caso implicarán actividades conducentes a un proceso reproductivo ni de utilización del ADN contenido en las mismas.

Firmado:

6. Referències

Ajina, T., Ammar, O., Haouas, Z., Sallem, A., Ezzi, L., Grissa, I., Sakly, W., Jlali, A., & Mehdi, M. (2017). Assessment of human sperm DNA integrity using two cytochemical tests: Acridine orange test and toluidine blue assay. *Andrologia*, 49(10), 1-6.

Álvarez, J. G. (2006). New advances in the study of sperm nuclear DNA integrity. *ASEBIR*, 11(1), 14-22.

Carlson, B. M. (2014). *Embriología Humana y Biología del Desarrollo* (5a ed.).

Enciso Lorences, M. (2009). *La fragmentación del ADN en espermatozoides de mamíferos*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Espanya.

Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*, 24(1), 59-66.

Gilbert, S. F. (2005). *Biología del Desarrollo* (7ª; Panamericana, Ed.). Buenos Aires - Madrid.

Hosseini, A., & Khalili, M. A. (2017). Improvement of motility after culture of testicular spermatozoa : the effects of incubation timing and temperature. *Translational Andrology and Urology*, 6(2), 271-276.

- Hou, J. W., Chen, D., & Jeyendran, R. S. (1995). Sperm Nuclear Maturity in Spinal Cord-Injured Men: Evaluation by Acidic Aniline Blue Stain. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 76(5), 444-445.
- Irez, T., Dayioglu, N., Alagöz, M., Karatas, S., & Güralp, O. (2018). The use of aniline blue chromatin condensation test on prediction of pregnancy in mild male factor and unexplained male infertility. *Andrologia*, 50(10).
- Nava-Trujillo, H., Hernández-Fernández, A., & Quintero-Moreno, A. (2012). Chromatin Integrity and Shape Head of Bull Sperm : Simultaneous Assessment. *Revista científica*, XXII(3), 211-216.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec*, 19(4), 426-463.
- Oumaima, A., Tesnim, A., Zohra, H., Amira, S., Ines, Z., Sana, C., Intissar, G., Lobna, E., Ali, J., & Meriem, M. (2018). Investigation on the origin of sperm morphological defects: oxidative attacks, chromatin immaturity, and DNA fragmentation. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 13775-13786.
- Pandiyan, N., Pandiyan, R., & Raja, D. R. (2017). A perspective on sperm DNA fragmentation. *Translational Andrology and Urology*, 6(S4), 661-664.
- Pourmasumi, S., Khoradmehr, A., Rahiminia, T., Sabeti, P., Talebi, A. R., & Ghasemzadeh, J. (2019). Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. *Journal of reproduction & infertility*, 20(2), 95-101.
- Rappa, K. L., Rodriguez, H. F., Hakkarainen, G. C., Anchan, R. M., Mutter, G. L., & Asghar, W. (2016). Sperm processing for advanced reproductive technologies : Where are we today ? *Biotechnology Advances*, 34(5), 578-587.
- Sadeghi Khomami, S. (2018). *An Experimental Approach to Oxidative Stress Effect on Sperm Motility and DNA Fragmentation* (Tesis doctoral). Universitat de Valencia, Valencia, Espanya.
- Sati, L., & Huszar, G. (2013). Methodology of Aniline Blue Staining of Chromatin and the Assessment of the Associated Nuclear and Cytoplasmic Attributes in Human Sperm. En *Spermatogenesis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (Vol. 927, p. 425-436).
- Steven Ward, W. (1993). Deoxyribonucleic Acid Loop Domain Tertiary Structure in Mammalian Spermatozoa1. *Biology of Reproduction*, 48(6), 1193-1201.
- Velázquez Cornejo, G. (2009). Fisiología De La Reproduccion Humana. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproduccion*, 1(4), 115-130.
- Zini, A., & Libman, J. (2006). Sperm DNA damage: Importance in the era of assisted reproduction. *Current Opinion in Urology*, 16(6), 428-434.